

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовано комисију:**

10 Наставно – научно Веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду је
11 на својој 166. седници од 23.03.2016.године именовало Комисију за оцену завршене докторске
12 дисертације кандидата др.вет. мед. Бојана Лукача.

13
14 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже**
15 **научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив факултета,**
16 **установе у којој је члан комисије запослен:**

- 17 1. др Јаков Нишавић, ванредни професор, Микробиологија са имунологијом, 2014.година,
18 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
19 2. др Ненад Милић, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2005.година,
20 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
21 3. др Дејан Крњавић, ванредни професор, Микробиологија са имунологијом, 2010.година,
22 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
23 4. др Јован Бојковски, редовни професор, Болести папкара, 2015.година, Факултет ветеринарске
24 медицине Универзитета у Београду
25 5. др Александра Кнежевић, ванредни професор, Микробиологија, 2014.година, Медицински
26 факултет Универзитета у Београду

27
28 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

- 29 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Бојан, Милован, Лукач
30 2. **Датум рођења, општина, Република:** 10.11.1984.године, Задар, Република Хрватска
31 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**
32 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

33
34 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

35 „Идентификација и молекуларна карактеризација цирковируса 2 и парвовируса код свиња са
36 територије Републике Српске, БиХ“

37
38 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
39 **шема, графикана и сл.):**

40 Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Бојана Лукача написана је на укупно 89 страна
41 компјутерски откуцаног текста и садржи сва прописана поглавља: Увод, Преглед литературе,
42 Циљи задаци испитивања, Материјал и методе испитивања, Резултати испитивања, Дискусија,
43 Закључци и Списак литературе као и кратак садржај на српском и енглеском језику. Поглавље
44 Увод је написано на 7 страница, поглавље Преглед литературе на 47 страница, Циљ и задаци
45 испитивања на једној страници, док су поглавља Материјал и методе испитивања и Резултати
46 испитивања написани на 9, односно 7 страница. Поглавље Дискусија написано је 4 странице,
47 Закључци на једној страници, док је поглавље Списак литературе написано на 8 страница.
48 Поред овога докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Бојана Лукача је документована и са
49 17 слика и 1 табелом.

50
51 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
52 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
53 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**

54 У поглављу **Увод** кандидат је описао основне биолошке особине свињског цирковируса
55 типа 2 и парвовируса свиња које подразумевају грађу и структуру вирусних честица, затим
56 карактеристике њихове репликације у културама ћелија и отпорност према факторима
57 спољашње средине. У уводу је описан етиолошки значај свињског цирковируса типа 2 и
58 парвовируса свиња у изазивању инфекције код животиња, односно основне карактеристике
59 патогенезе и клиничке слике обољења која настају као последица инфекције свиња претходно
60 поменути вирусима. Поред овога, кандидат се у уводу осврнуо и на могућност спровођења

1 превентивних мера у запатима животиња чијом применом би се спречила појава инфекција
2 свиња изазваних свињским цирковирусом типа 2 и парвовирусом свиња. Имајући ово у виду
3 кандидат, поред примене одговарајућих зоохигијенских мера, наводи да се данас у запатима
4 свиња све више спроводи вакцинација животиња различитим врстама комерцијалних вакцина. У
5 овом делу докторске дисертације кандидат је навео које се лабораторијске методе вирусолошке
6 дијагностике користе у циљу откривања присуства свињског цирковируса типа 2 (PCV2) и
7 парвовируса свиња (PPV) у узорцима пореклом од свиња. Кандидат у уводу такође наводи да се
8 имајући у виду да до данас не постоје новији подаци о присуству и молекуларним
9 карактеристикама сојева свињског цирковируса тип 2 и парвовируса свиња код животиња на
10 територији Републике Српске, што се може сазнати и из података из стране литературе у којима
11 се наводи да је Босна и Херцеговина земља са непознатим статусом инфекција свиња изазваних
12 вирусом PCV2 и парвовирусом свиња, определио да испита присуство наведених вируса код
13 свиња на територији поменуте државе.

14 У поглављу **Преглед литературе** кандидат је детаљно изложио резултате истраживања из
15 86 радова страних и домаћих аутора. Свињски цирковирус тип 2 припада фамилији *Circoviridae*
16 и роду *Circovirus*. Геном цирковируса типа 2 свиња се састоји од циркуларног, једноланчаног и
17 позитивно оријентисаног молекула ДНК. Вируси из фамилије *Circoviridae* не поседују
18 спољашњи омотач, сферичног су облика, а капсид је икосаедричне симетрије. Молекул ДНК
19 вируса PCV2 садржи шест ORF региона (*Open Reading frames; ORFs*) од којих су најзначајнија
20 два и то ORF1 и ORF2. Наведени региони поседују информације за синтезу одређених протеина
21 вируса који су непоходни за одвијање процеса вирусне инфекције ћелије и репликацију вируса.
22 Вируси који припадају фамилији *Circoviridae* су релативно отпорни у спољашњој средини.
23 Поред овога, кандидат је у овом поглављу представио резултате више аутора који су се
24 односили на основне карактеристике генома свињског цирковируса типа 2, односно резултате
25 утврђивања сличности и разлика између генома појединих сојева свињског цирковируса типа 2
26 идентификованих у запатима свиња у различитим деловима света. Овде треба напоменути да су
27 до данас откривена четири генотипа вируса који изазивају инфекције код свиња у свету. То су
28 генотипови „a“, „b“, „c“ и „d“. Парвовирус свиња припада фамилији *Parvoviridae* и подфамилији
29 *Parvovirinae*. Геном вируса се састоји од линеарног и једноланчаног молекула ДНК. Не поседује
30 спољашњи омотач, а капсид вируса је састављен од 60 молекула вирусних VP2 протеина и
31 неколико молекула протеина VP1. Трећи протеин капсида је означен као VP3. Вируси који
32 припадају овој фамилији су отпорни на дејство растварача масти, различите вредности рН
33 средине и температуру од 56°C током 30 минута до 1 час. У овом поглављу кандидат је
34 представио резултате испитивања страних аутора који се односе на испитивања карактеристика
35 генома различитих сојева парвовируса свиња идентификованих у запатима свиња у свету.
36 Добијени резултати испитивања су указали на висок степен сличности између генома
37 различитих сојева парвовируса свиња идентификованих код свиња у појединим деловима света.
38 У оквиру овог поглавља кандидат је представио литературне податке који се односе на
39 патогенезу инфекција изазваних свињским цирковирусом типа 2 и парвовирусом свиња.
40 Инфекција свиња цирковирусом типа 2 настаје ингестијом или инхалацијом вируса, а у
41 запатима свиња се вирус преноси директним контактом између животиња. Литературни подаци
42 указују на то да се цирковирус свиња типа 2, после уласка у организам најпре умножава у
43 тонзилама. Неки аутори наводе да се вирус може наћи у ћелијама бубрега и плућа, глатких
44 мишића, односно у макрофагима и епителним ћелијама тестиса. Инфекција свиња изазвана
45 парвовирусом свиња настаје ингестијом или инхалацијом вируса, односно путем семена. После
46 уласка у организам долази до репликације вируса у лимфним чворовима, тонзилама, тимусу,
47 слезини, плућима, периферним лимфоцитима и другим органима и појаве виремије. Вирус
48 посебно напада митотички активне ћелије феталног ткива. Према литературним подацима, ток и
49 исход парвовирусне инфекције свиња зависи од имуног статуса инфициране животиње и
50 стадијума гравидитета у тренутку настанка инфекције. У овом поглављу кандидат наводи да се
51 обољења код свиња изазвана свињским цирковирусом типа 2 манифестују појавом
52 мултисистемског синдрома кржљавости прасади, развојем синдрома дерматитиса свиња и
53 нефритиса или репродуктивним поремећајима код животиња. Свиње инфициране свињским
54 цирковирусом типа 2 не испољавају увек клиничке симптоме обољења. Данас се сматра да
55 неспецифични фактори спољашње средине имају значајну улогу у настанку обољења код
56 животиња. Парвовирус свиња изазива обољење које се манифестује поремећајем
57 репродуктивних способности свиња – превременим рођењем прасади, мумификацијом фетуса,
58 раном ембрионалном смрћу и појавом неплодности код крмача. Инфекција ембриона у првим
59 недељама гестације доводи до угинућа и његове ресорпције. Инфекција фетуса у касној фази
60 гестације пре 70. дана има за последицу угинуће и мумификацију, а инфекција после 70. дана

1 гестације рођење здраве серопозитивне прасади. Део поглавља Прегледа литературе кандидат је
2 посветио лабораторијској дијагностици инфекција свиња изазваних вирусима PCV2 и PPV. У
3 наведене сврхе данас је у употреби више класичних и молекуларних метода вирусолошке
4 дијагностике.

5 У поглављу **Циљ и задаци испитивања** кандидат наводи да је циљ ових испитивања
6 идентификација и молекуларна карактеризација сојева свињског цирковируса типа 2 и
7 парвовируса идентификованих код свиња гајених у екстензивном начину држања у различитим
8 регионима Републике Српске. У циљу реализације предвиђених испитивања, постављени су
9 следећи задаци:

- 10 1. Прикупљање узорак (слезина, лимфни чворови) пореклом од невакцинисаних свиња
11 различитих старосних категорија из екстензивног узгоја, са или без клиничких симптомима
12 обољења.
- 13 2. Испитивање присуства генома цирковируса тип 2 свиња и парвовируса свиња у
14 прикупљеним узорцима применом ланчане реакције полимеразе (PCR).
- 15 3. Утврђивање евентуалног присуства мешовите инфекције свиња изазване цирковирусом тип
16 2 свиња и парвовирусом свиња.
- 17 4. Изолација свињског цирковируса типа 2 из узорак у којима је претходно утврђено
18 присуство нуклеинских киселина вируса после инокулације узорак у културе ћелија и
19 потврда присуства вируса применом методе ланчане реакције полимеразе.
- 20 5. Изолација парвовируса свиња из узорак у којима је претходно утврђено присуство
21 нуклеинских киселина вируса после инокулације узорак у културе ћелија методом
22 инхибиције хемаглутинације (HI тест) и применом методе ланчане реакције полимеразе
23 (PCR).
- 24 6. Секвенцирање генома идентификованих сојева вируса PCV2 и PPV у циљу одређивања
25 редоследа нуклеотида дела ORFV1 региона генома цирковируса 2 свиња, односно редоследа
26 нуклеотида дела VP2 гена парвовируса свиња применом методе по Сангер-у.
- 27 7. Филогенетском анализом извршиће се упоређивање секвенци идентификованих и
28 евентуално изолованих сојева цирковируса 2 свиња и парвовируса свиња установљених у
29 узорцима свиња пореклом са територије Републике Српске са нуклеотидним секвенцама
30 референтних сојева вируса и вируса изолованих код свиња у другим деловима света које се
31 налазе у бази нуклеотидних секвенци у циљу утврђивања сличности и разлика између њих.

32 У поглављу **Материјал и методе испитивања** кандидат је навео материјал и методе које је
33 користио у својим испитивањима.

34 У циљу реализације испитивања извршено је прикупљање осамдесет збирних узорак ткива
35 и органа (слезина, лимфни чворови, плућа) пореклом од невакцинисаних свиња из екстензивног
36 начина гајења из више региона Републике Српске. Један збирни узорак свиња чинили су узорци
37 лимфних чворова, плућа и слезине пореклом од једне свиње. Свиње од којих је вршено
38 прикупљање узорак су биле различитих старосних категорија са или без клиничких симптома
39 болести.

40 Прикупљени узорци свиња су до почетка испитивања стављани у хранљиву подлогу Eagle-
41 MEM са 2% феталног телећег серума, замрзавани и чувани на температури од -20°C.

42 Референтни сој 1010-PCV2 свињског цирковируса типа 2 (НИВ Нови Сад, Србија) служио је
43 као позитивна контрола током извођења методе PCR. Сој Teen парвовируса свиња (American
44 Bioresearch, САД), служио је као позитивна контрола код извођења метода PCR и изолације
45 вируса у култури ћелија.

46 Откривање присуства нуклеинских киселина цирковируса свиња типа 2 (PCV2) и свињског
47 парвовируса (PPV) у испитиваним узорцима вршено је применом методе ланчане реакције
48 полимеразе уз коришћење прајмера за део ORF1 региона генома вируса PCV2 (forward 5-
49 CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT-3 и reverse 5-TCG ATCACACAGTCTCAGTAG- 3,
50 произвођача Metabion International, Немачка) и прајмера за део VP2 гена вируса PPV (forward 5-
51 CACAGAAGCAACAGCAATTAGG-3 и reverse 5-CTAGCTCTTGTGAAGATGTGG-3-
52 произвођача Metabion International, Немачка).

53 За доказивање присуства сојева цирковируса 2 свиња, претходно идентификованих у
54 узорцима свиња методом ланчане реакције полимеразе, односно за изолацију и идентификацију
55 сојева свињског парвовируса из узорак у којима је претходно доказано присуство нуклеинске
56 киселине наведеног вируса, коришћене су две ћелијске линије PK-15 и SK-6 (Istituto
57 Zooprofilattico Sperimentale, Бреша, Италија).

58 Секвенцирање делова генома вируса PCV2 и PPV вршено је применом методе директног
59 секвенцирања по Сангер-у уз коришћење дијагностичког средства за пречишћавање добијених
60 нуклеинских киселина вируса QIA quick Purification Kit (произвођача Qiagen, САД).

1 Поступак екстракције нуклеинских киселина свињског цирковируса типа 2 и парвовируса
2 свиња из испитиваних узорача вршен је коришћењем дијагностичког средства за екстракцију
3 вирусне ДНК Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, САД)
4 по упутству произвођача.

5 Протокол за извођење ланчане реакције полимеразе (PCR) за откривање присуства
6 нуклеинске киселине свињског цирковируса типа 2 је обухватао примарну денатурацију на
7 температури од 95°C током временског периода од 4 минута, затим 35 циклуса денатурације на
8 температури од 95°C током 30s, везивања прајмера на температури од 56°C за 30s и
9 продужавања ланца на температури од 72 °C у временском периоду од 1 минут и на крају
10 финалну елонгацију на температури од 72 °C у трајању од 10 минута.

11 Протокол за извођење ланчане реакције полимеразе (PCR) за откривање присуства
12 нуклеинске киселине парвовируса свиња је обухватао примарну денатурацију на температури
13 од 95°C током временског периода од 4 минута, затим 36 циклуса денатурације на температури
14 од 95°C током 30s, везивања прајмера на температури од 55°C за 30s и продужавања ланца
15 температури од 72 °C у временском периоду од 1 минут и финалну елонгацију на температури
16 од 72 °C у трајању од 10 минута.

17 Резултати извођења методе ланчане реакције полимеразе су читавани после извођења
18 хоризонталне гел електрофорезе. Присуство ДНК фрагмената величине од 703bp за свињски
19 цирковирус типа 2 и ДНК фрагмената величине од 203bp за свињски парвовирус у гелу агарозе,
20 сматрано је позитивним налазом.

21 Прикупљени узорци пореклом од свиња, у којима је претходно методом ланчане реакције
22 полимеразе утврђено присуство нуклеинских киселина вируса PCV2 и PPV, појединачно су
23 инокулисани у ћелијске линије PK-15 и SK-6 које су се, свака линија посебно, налазиле у
24 микротитрационим плочама са 24 удубљења. У сва удубљења микротитрационих плоча са
25 ћелијским линијама је појединачно додато по 100µl испитиваних узорача. Микротитрационе
26 плоче са узорцима су затим инкубисане на температури од 37° C у трајању од 1 час у околини
27 која је била засићена са 5% CO₂. По истеку наведеног временског периода, у сва удубљења
28 микротитрационих плоча је појединачно додато по 500µl хранљиве подлоге Eagle-MEM са 2%
29 феталног телећег серума (РАА, Аустрија). Овако припремљене микротитрационе плоче са
30 узорцима су затим стављене у термостат на температуру од 37°C и свакодневно опсервиране на
31 појаву цитопатогеног ефекта (CPE).

32 Откривање присуства свињског цирковируса типа 2 у инокулисаним ћелијским линијама је
33 вршено применом методе ланчане реакције полимеразе по претходно описаном протоколу
34 извођења, коме је претходила екстракција вирусне нуклеинске киселине из ћелија по процедури
35 прописаној од стране произвођача дијагностичког средства за екстракцију вирусне ДНК Thermo
36 Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, САД).

37 Идентификација евентуално изолованих сојева парвовируса свиња у испитиваним
38 узорцима после њихове појединачне инокулације у ћелијске линије PK-15 и SK-6, вршена је
39 применом тестова хемаглутинације и инхибиције хемаглутинације по стандардној процедури
40 извођења.

41 Секвенцирање делова генома шест идентификованих сојева свињског цирковируса типа 2 и
42 пет сојева парвовируса свиња је извршено применом методе директног секвенцирања по
43 Сангер-у. Пре извођења наведене методе вршено је пречишћавање ДНК продуката добијених
44 претходним испитивањем узорача свиња применом методе ланчане реакције полимеразе.
45 Поступак пречишћавања добијених ДНК продуката је извођен применом дијагностичког
46 средства за пречишћавање QIA quick PCR Purification Kit“ произвођача „Qiagen“, САД, по
47 упутству произвођача.

48 Узорци пречишћених PCR продуката су затим коришћени за припрему PCR мешавине за
49 извођење cycle sequencing PCR реакције. PCR мешавина је по једном узорку садржавала
50 следеће: 2 µl Dye Mix, 2 µl Dye buffer, прајмер F forward 1,2 µl, воде 1,8 µl и 3 µl пречишћеног
51 PCR продукта. Иста таква мешавина је истовремено припремана за сваки узорак посебно, с тим
52 што је уместо „forward“ прајмера, садржавала „reverse“ прајмер.

53 Cycle sequencing PCR реакција је извођена по следећем протоколу: 30 циклуса денатурације
54 на температури од 96°C у трајању од 10 sec, везивања прајмера на 50°C током 5 sec. и
55 елонгације на температури од 60°C у временском периоду од 4 минута.

56 После завршетка извођења cycle sequencing PCR реакције, добијени PCR производ је
57 третиран у циљу накнадног пречишћавања са 75% изопропанолом и затим денатуриран на
58 температури од 95°C током временског периода од 2 минута. На овај начи су узорци
59 припремљени за извођење методе директног секвенцирања по Сангер-у у секвенционеру ABI
60 Prism 310 Genetic Analyzer.

1 Применом методе директног секвенцирања вршено је одређивање редоследа нуклеотида
2 дела ORF1 региона цирковируса свиња типа 2 и дела VP2 гена свињског парвовируса. По
3 завршеном извођењу поступка директног секвенцирања по Сангер-у, нуклеотидне секвенце
4 сојева свињског цирковируса типа 2 и парвовируса свиња идентификованих из узорака свиња
5 пореклом са територије Републике Српске су, применом одговарајућег компјутерског софтвера,
6 упоређиване са познатим секвенцама наведених сојева вируса које се налазе у генској бази
7 података у циљу утврђивања сличности или разлика између њих (Gene Bank database using
8 BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)).

9 Филогенетска анализа извршена применом компјутерског програма МЕГА 6, омогућила је
10 утврђивање сличности или разлика између нуклеотидних секвенци сојева вируса PCV2 и PPV
11 идентификованих код свиња на територији Републике Српске са секвенцама референтних
12 сојева, односно изолованих сојева наведених вируса који се налазе објављене у генској бази
13 података.

14 Филогенетска стабла су конструисана коришћењем Neighbor-joining, Maximum likelihood и
15 Maximum parsimony метода. Статистичка подршка остварена је бутстреп техником са 100
16 понављања.

17 У поглављу **Резултати испитивања** кандидат је прегледно и детаљно изнео резултате
18 својих испитивања. Применом методе ланчане реакције полимеразе (PCR), код шест од укупно
19 осамдесет збирних узорака утврђено је присуство нуклеинске киселине свињског цирковируса
20 типа 2, односно код 7,5% од укупног броја испитаних збирних узорака (слезина, лимфни
21 чворови, плућа). Појединачним испитивањем позитивних узорака свиња на присуство наведеног
22 вируса је утврђено код четири узорка лимфних чворова и два узорка ткива слезине.
23 Испитивањем истих узорака свиња методом ланчане реакције полимеразе, присуство
24 нуклеинске киселине свињског парвовируса је установљено код пет збирних узорака, односно
25 код 6,25% од укупног броја испитаних збирних узорака свиња. После појединачног испитивања
26 позитивних збирних узорака, присуство вирусне нуклеинске киселине је откривено код пет
27 узорака лимфних чворова свиња.

28 Применом методе ланчане реакције полимеразе, мешовита инфекција изазвана свињским
29 цирковирусом типа 2 и парвовирусом свиња установљена је код три узорка лимфних чворова
30 пореклом од три различите животиње, односно код 3,75% од укупног броја животиња од којих
31 су прикупљени узорци за испитивања.

32 Сви прикупљени узорци свиња, у којима је применом методе ланчане реакције полимеразе
33 утврђено присуство нуклеинске киселине цирковируса свиња типа 2, појединачно су
34 инокулисани у ћелијске линије PK-15 и SK-6 ради испитивања на присуство претходно
35 наведеног вируса. Овде треба напоменути да свињски цирковирус типа 2 у ћелијским линијама
36 не изазива појаву цитопатогеног ефекта, тако да се његово присуство у узорцима данас доказује
37 применом молекуларних и имунохистохемијских метода. После 72 часа од појединачне
38 инокулације ћелијских линија, вршено је утврђивање присуства вирусне ДНК у инокулисаним
39 ћелијама применом методе ланчане реакције полимеразе по претходно описаном протоколу. Ни
40 у једном узорку ћелија није утврђено присуство нуклеинске киселине свињског цирковируса
41 типа 2.

42 Узорци свиња који су, после испитивања применом ланчане реакције полимеразе, били
43 позитивни на присуство нуклеинске киселине свињског парвовируса, појединачно су
44 инокулисани у ћелијске линије PK-15 и SK-6 ради изолације вируса. Идентификација
45 евентуално изолованих сојева наведеног вируса је вршена применом тестова хемаглутинације и
46 инхибиције хемаглутинације. После четири узастопне пасаже узорака у ћелијским линијама
47 применом претходно наведених тестова није извршена идентификација парвовируса свиња ни у
48 једном узорку. Применом ланчане реакције полимеразе није утврђено присуство нуклеинске
49 киселине парвовируса свиња ни у једном узорку претходно инокулисане културе ћелија.

50 Применом методе директног секвенцирања методом по Сангер-у, код свих шест
51 идентификованих нуклеинских киселина свињског цирковируса типа 2 извршено је одређивање
52 редоследа нуклеотида дела ORF1 региона генома вируса. Међусобним упоређивањем
53 нуклеотидних секвенци дела ORF1 региона свих шест идентификованих нуклеинских киселина
54 свињског цирковируса типа 2 пореклом од свиња са територије Републике Српске, утврђено је
55 да су исте испољавале изузетно висок степен сличности. Добијени резултати извођења методе
56 директног секвенцирања по Сангер-у су потврдили висок степен сличности између
57 нуклеотидних секвенци вируса идентификованих код свиња на територији Републике Српске са
58 нуклеотидном секвенцом соја Mantova вируса PCV2 изолованог код свиња у Италији, затим са
59 секвенцама сојева DE006-14 и DE222-13 изолованих код свиња у Немачкој, као и са секвенцом
60 соја Jvnap који је изолован код свиња у Кини. Нуклеотидне секвенце шест идентификованих

1 сојева вируса PCV2 су имале нижи степен сличности са нуклеотидним секвенцама сојева
2 НИВС-Ц идентификованог код свиња у Србији и DK1987PMWS, изолованог код свиња у
3 Данској.

4 Филогенетском анализом, у коју су били укључени сви претходно наведени сојеви вируса,
5 утврђено је да шест нуклеотидних секвенци вируса PCV2 идентификованих код свиња у
6 Републици Српској, припадају генотипу „с“ наведеног вируса.

7 Применом методе директног секвенцирања по Сангер-у, извршено је одређивање
8 редоследа нуклеотида дела гена који кодира синтезу VP2 протеина свињског парвовируса свих
9 пет идентификованих сојева вируса. Нуклеотидне секвенце пет идентификованих сојева вируса
10 су између себе испољавале висок степен сличности. Њиховим упоређивањем са нуклеотидним
11 секвенцама референтних сојева и сојева парвовируса свиња изолованим у другим земљама, а
12 објављеним у генској бази података, утврђено је да су исте имале висок степен сличности
13 (100%) са секвенцом соја Challenge, изолованог код свиња на територији Велике Британије,
14 затим соја Kresse изолованог код свиња у САД, односно са нуклеотидним секвенцама сојева 77
15 i LZ парвовируса свиња изолованих у Кини.

16 Филогенетска анализа пет нуклеотидних секвенци парвовируса свиња пореклом из
17 Републике Српске, у коју су били укључени претходно наведени сојеви вируса изоловани у
18 другим деловима света, показала је да сви наведени сојеви вируса припадају истој грани на
19 стаблу, односно да чине једну монофилетску групу. За сој NADL вируса PPV који је изолован
20 код свиња у САД и сој VR-1 пореклом од свиња из Јужне Кореје, филогенетском анализом је
21 установљено да припадају посебној грани стабла, односно посебној монофилетској групи.

22 У поглављу **Дискусија** кандидат је добијене резултате својих испитивања упоређивао са
23 резултатима сличних испитивања страних аутора.

24 У поглављу **Списак литературе** кандидат је навео списак од 86 коришћених референци.

25 26 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској** 27 **дисертацији):**

- 28 1. Применом ланчане реакције полимеразе, присуство свињског цирковируса типа 2
29 (PCV2) и парвовируса свиња (PPV) је откривено код 6 и 5 од укупно 80 збирних узорака,
30 односно код 7,5% и 6,25% од укупног броја испитаних узорака.
- 31 2. Мешовита инфекција свиња изазвана вирусима PCV2 и PPV утврђена је код три
32 животиње.
- 33 3. Ниједан сој свињског цирковируса типа 2 и свињског парвовируса није изолован и
34 идентификован после појединачне инокулације прикупљених узорака свиња у културе
35 ћелија РК-15 и SK-6.
- 36 4. Добијени резултати испитивања су потврдили оправданост коришћења молекуларних
37 метода заснованих на ланчаној реакцији полимеразе у циљу откривања присуства
38 наведених вируса код супклинички инфицираних животиња.
- 39 5. Нуклеотидне секвенце шест идентификованих вируса PCV2 имале су висок степен
40 сличности (99%) са нуклеотидним секвенцама сојева наведеног вируса чије је присуство
41 утврђено код свиња пореклом из Италије, Немачке и Кине.
- 42 6. Филогенетска анализа уз примену Neighbor-joining, Maximum likelihood и Maximum
43 parsimony метода је показала усклађеност резултата грањања стабала и да свих шест
44 вируса PCV2 идентификовани код свиња на територији Републике Српске припадају
45 генотипу „с“ наведеног вируса.
- 46 7. Нуклеотидне секвенце пет свињских парвовируса идентификованих код свиња у
47 Републици Српској имале су висок степен сличности (100%) са секвенцама сојева
48 наведеног вируса утврђених код свиња пореклом из Велике Британије, САД и Кине.
- 49 8. Филогенетском анализом је утврђено да парвовируси свиња пореклом из Републике
50 Српске и сојеви наведеног вируса пореклом из Велике Британије, САД и Кине
51 припадају истој монофилетској групи.

52 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** 53 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима** 54 **истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):**

55 Комисија сматра да су добијени резултати испитивања у складу са постављеним циљем и
56 задацима истраживања и да закључци ове докторске дисертације произилазе из добијених
57 резултата.

58 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

- 59
60 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

1 Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Бојана Лукача је написана у складу са
2 образложењем наведеним у пријави теме.

3 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију?**

4 Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Бојана Лукача садржи све елементе
5 прописане за завршену докторску дисертацију.

6 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

7 Испитивања која су била предмет ове докторске дисертације имала су за циљ
8 идентификацију и молекуларну карактеризацију цирковируса типа 2 свиња и парвовируса свиња
9 код животиња пореклом са територије Републике Српске, БиХ. Овде треба напоменути да
10 програмом обавезне вакцинације свиња у Републици Српској није обухваћено и спровођење
11 вакцинације животиња против инфекција изазваних наведеним вирусима. Поред овога, изузетно
12 је важно нагласити да данас не постоје релевантни подаци о присуству свињског цирковируса
13 типа 2 и парвовируса свиња на територији Републике Српске као ни подаци о молекуларним
14 карактеристикама генома наведених вируса присутних код животиња на овој територији.
15 Имајући у виду напред наведено, добијени резултати испитивања приказани у оквиру ове
16 докторске дисертације, пружају податке о присуству и молекуларној карактеризацији сојева
17 свињског цирковируса типа 2 и парвовируса свиња идентификованих код животиња на
18 територији Републике Српске. Делови нуклеотидних секвенци идентификованих сојева вируса
19 утврђени применом молекуларних метода, упоређивани су са аналогним нуклеотидним
20 секвенцама сојева цирковируса 2 свиња и парвовируса свиња изолованих широм света у циљу
21 утврђивања сличности и разлика између њих. На овај начин остварен је увид у степен
22 подударности нуклеотидних секвенци вируса идентификованих код свиња у Републици Српској
23 и сојева вируса из других делова света. Поред овога, добијени резултати испитивања су
24 потврдили оправданост коришћења молекуларних метода заснованих на ланчаној реакцији
25 полимеразе у циљу брзе и поуздане идентификације претходно наведених вируса у испитиваним
26 узорцима, посебно у случајевима супклиничких инфекција животиња.

27
28 **IX ПРЕДЛОГ:**

29 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три**
30 **понуђених могућности):**

31 На основу укупне оцене докторске дисертације др.вет.мед. Бојана Лукача, комисија
32 предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

33
34 ДАТУМ
35 8.04.2016.године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

36
37
38 _____
39 Др Јаков Нишавић, ван.проф.
40 Факултет ветеринарске медицине
41 Универзитета у Београду

42
43 _____
44 Др Ненад Милић, ред.проф.
45 Факултет ветеринарске медицине
46 Универзитета у Београду

47
48 _____
49 Др Дејан Крњавић, ван.проф.
50 Факултета ветеринарске медицине
51 Универзитета у Београду

52
53 _____
54 Др Јован Бојковски, ред.проф.
55 Факултет ветеринарске медицине
56 Универзитета у Београду

57
58 _____
59 Др Александра Кнежевић, ван.проф.
60 Медицински факултет
Универзитета у Београду