

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE  
6

7  
8 I PODACI O KOMISIJI:  
9

10 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

11 20. 12. 2017. godine

12 Nastavno - naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na svojoj  
13 182. sednici.

14  
15 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže  
16 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,  
17 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

18 Dr Miroslav Valčić, redovni profesor, uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne  
19 bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja, izbor u zvanje 2009. godine, Fakultet  
20 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

21 Dr Maja Velhner, naučni savetnik, uža naučna oblast: Mikrobiologija i zarazne  
22 bolesti, izbor u zvanje, decembar, 2005. godine, Naučni institut za veterinarstvo, Novi  
23 Sad

24 Dr. Milorad Mirilović, redovni profesor uža naučna oblast: Veterinarska  
25 ekonomika, izbor u zvanje 2014. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta  
26 u Beogradu.

27  
28  
29 II PODACI O KANDIDATU:  
30

31 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Miroљjub Dobrosav Dačić

32  
33 2. Datum rođenja, opština, Republika: 31. 07. 1964., Paraćin

34  
35 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*: 19. 05. 2005., Beograd, Fakultet  
36 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Uticaj Gamboro bolesti na ekonomske  
37 gubitke u živinarstvu na epizootiološkom području Šumadije i Pomoravlja.

38  
39 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:

40 Patologija i terapija životinja  
41  
42

43 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

44 Imunski odgovor koka nosilja u odgoju, nakon primene rekombinantne vektorske i  
45 živih modifikovanih vakcina protiv infektivne burzalne bolesti

46  
47 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,  
48 grafikona i sl.):

49 Doktorska disertacija magistra Miroљjuba Dačića je napisna na ukupno 108 strana  
50 kompjuterski složenog teksta u A4 formatu. Sadrži sledeća poglavlja: Uvod 2 strane; Pregled  
51 literature 33 strane; Cilj i zadaci rada 1 strana; Materijal i metode rada 12 strane; Rezultati 21  
52 strana; Diskusija 22 strane; Zaključak 2 strane i Literatura 15 strana. Tekst disertacije počinje  
53 kratkim sadržajem na srpskom i engleskom jeziku, a ostala poglavlja su ilustrovana sa 4 slike,  
54 24 tabele i 27 grafikona. Poglavlje Materijal i metode rada ima 13 grafikona i poglavlje  
55 Rezultati 24 tabele, 14 grafikona i 4 slike.

56  
57 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis  
58 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,  
59 materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

1 U **Uvodu** kandidat ističe značaj Gamboro bolesti za industrijsko živinarstvo. Gamboro bolest,  
2 odnosno infektivna burzalna bolest je jedna od najvažnijih bolesti savremenog industrijskog  
3 živinarstva od njenog otkrića, šezdesetih godina prošlog veka, pa sve do danas. Ekonomske  
4 štete koje nastaju kao posledica bolesti očituju se kako u direktnim gubicima, usled velikog  
5 broja uginulih jedinki, tako i u indirektnim gubicima usled posledične imunosupresije,  
6 konkurentnih infekcija, lošeg vakcinalnog odgovora, odbačenih trupova na klanici itd.  
7 Kandidat posebno ističe sve mere koje se primenjuju u kontroli bolesti i navodi da se kontrola  
8 bolesti sprovodi pre svega primenom svih biosigurnosnih mera, poštovanjem tehnoloških  
9 normativa i naravno, pravovremenom imunizacijom živine. Zatim, razmatra različite načine  
10 imunizacije, odnosno vrste vakcina i mehanizme njihovog delovanja. Kandidat takođe daje  
11 kraći osvrt na kretanje Gamboro bolesti na teritoriji Republike Srbije i vakcinalne programe  
12 koji se primenjuju u borbi protiv ove bolesti. U daljem tekstu se razmatra mogućnost primene  
13 rekombinantne vakcine protiv Gamboro bolesti koja sadrži vHVT013-69 rekombinovani virus  
14 u cilju prevazilaženja problema koji je skopčan sa prisustvom maternalnih antitela koja mogu  
15 da interferiraju sa imunizacijom, a koji se javlja kod primene klasičnih vakcina protiv Gamboro  
16 bolesti.

17  
18 U poglavlju **Pregled literature** kandidat u prvom potpoglavlju daje definiciju Gamboro bolesti,  
19 a nakon toga iznosi istorijske podatke od momenta prvog opisa bolesti od strane Cover-a, pa  
20 do trenutne rasprostranjenosti u celom svetu. U drugom potpoglavlju se razmatra ekonomski  
21 značaj Gamboro bolesti i koji sve faktori utiču na direktne i indirektno ekonomske gubitke  
22 usled oboljevanja pilića od ove bolesti. Ovde se takođe diskutuje o mogućnosti smanjenja  
23 ekonomskih šteta primenom različitih tipova vakcina u imunoprofilaksi Gamboro bolesti, kao i  
24 o idealnom uzrastu pilića za vakcinaciju u cilju prevazilaženja imunskog „jaza“. Treće  
25 potpoglavlje je posvećeno virusu Gamboro bolesti, u prvom redu klasifikaciji i molekularnoj  
26 strukturi virusa. Poseban značaj se pridaje strukturnim proteinima, naročito proteinu VP2 koji  
27 predstavlja glavni antigen virusa koji je odgovoran za sintezu antitela kod živine, s jedne  
28 strane i određivanju nukleotidnih sekvenci i aminokiselina kapsida virusa, što je veoma važno  
29 za dobijanje informacija o antigenosti i patogenosti virusa Gamboro bolesti. Dalje se  
30 razmatraju različiti serotipovi virusa Gamboro bolesti i mogućnost kultivisanja virusa na  
31 ćelijama *in vitro*. Nakon toga se prikazuju podaci o epidemiologiji Gamboro bolesti, odnosno  
32 načinu prenošenja, vremenu kada je živina najprijemčivija za infekciju, mogućnosti  
33 perzistentne infekcije i mogućnostima preživljavanja virusa u različitim uslovima sredine.  
34 Nakon toga se razmatra na koji način virus dovodi do oštećenja tkiva domaćina i kako dolazi  
35 do imunosupresije i daje se prikaz tropizma virusa prema tkivu burze Fabricii i promena koje  
36 se u njoj dešavaju nakon infekcije tokom svih faza razvoja bolesti. Sledeće potpoglavlje je  
37 posvećeno opisu kliničke slike u klasičnom, imunosupresivnom i akutnom obliku Gamboro  
38 bolesti. Nakon toga, kandidat detaljno daje prikaz patoanatomskih promena, pre svega na  
39 burzi Fabricii, ali i na drugim organima pilića obolelih od Gamboro bolesti. Posebno  
40 potpoglavlje je posvećeno postavljanju dijagnoze, odnosno dijagnostici Gamboro bolesti od  
41 anamnestičkih podataka, preko kliničke slike i patoanatomskih promena, do laboratorijske  
42 dijagnostike. Navodi se da je serološka dijagnostika sama po sebi od manjeg značaja jer  
43 serološki testovi ne razlikuju specifična antitela protiv virusa Gamboro bolesti u odnosu na  
44 njihovo poreklo, odnosno da li je njihovo stvaranje posledica prisustva patogenog, terenskog  
45 soja virusa ili vakcinalnog virusa. U daljem tekstu se razmatraju drugi dijagnostički testovi  
46 poput: imunoenzimskog testa, agar gel precipitacije, serum neutralizacionog testa i naravno,  
47 molekularnih metoda koje se primenjuju u dijagnostici Gamboro bolesti, kao i izolacija virusa  
48 na embrioniranim SPF jajima i kulturama tkiva pilećih fibroblasta. U ovom potpoglavlju se  
49 diskutuje i o molekularnim osnovama antigenskih varijacija, odnosno o markerima virulencije.  
50 Sledeće potpoglavlje je posvećeno kontroli i prevenciji Gamboro bolesti, odnosno atenuiranim  
51 živim vakcinama, inaktiviranim uljnim vakcinama, imuno-kompleks vakcinama i pre svega  
52 rekombinantnim vektorskim vakcinama, njihovom razvoju, primeni, odnosno bezbednosti i  
53 efikasnosti. Sledeće poglavlje obrađuje imunski sistem ptica i njegove specifičnosti, sa  
54 fokusom na burzu Fabricii, ali i druga limfatična tkiva poput timusa, ileocekalnih tonzila,  
55 slezine i Harderijeve žlezde.

56

1 **Cilj** istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bio ispitivanje stepena zaštite,  
2 rekombinantne vakcine VHVT013-69 protiv Gamboro bolesti kod koka nosilja u odgoju  
3 praćenjem humoralnog i celularnog imunskog odgovora i burza bodi indeksa i da se na  
4 osnovu tih rezultata dođe do odgovora da li je na području gde je u velikom procentu na  
5 terenu prisutan „divlji“ Gamboro virus moguće primeniti ovaj tip rekombinovane vakcine u cilju  
6 imunoprofilakse.

7  
8 Radi ostvarivanja zadatih ciljeva istraživanja definisani su sledeći zadaci:

- 9 • Određivanje visine titra maternalnih antitela na Gamboro bolest kod jednodnevnih  
10 pilića
- 11 • Vakcinacija jednodnevnih pilića koka nosilja rekombinantnom vektor HVT-IBD  
12 vakcinom u inkubatorskoj stanici
- 13 • Vakcinacija pilića klasičnim, živim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti  
14 (intermedijerna i intremedijerna plus), atipične kuge živine i infektivnog bronhitisa, na  
15 osnovu predviđenog programa vakcinacije tokom odgoja koka nosilja
- 16 • Određivanje titra antitela ELISA (ProFLOK i ProFLOK plus) i Hi testom.
- 17 • Veštačka infekcija pilića (eng. challenge test) virusom infektivne burzalne bolesti vrlo  
18 virulentnim sojem IBD virusa – CH/99
- 19 • Kliničko praćenje zdravstvenog stanja pilića nakon veštačke infekcije
- 20 • Patoanatomsko ispitivanje
- 21 • Određivanje vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa“ (BBR indeks) nakon  
22 žrtvovanja pilića, 7 dana nakon vakcinacije, 11 dana nakon veštačke infekcije i 70.  
23 dana starosti pilića
- 24 • Ispitivanje periferne krvi koka nosilja u odgoju radi određivanja cirkulišućih B i T  
25 limfocita metodom protočne citometrije (Flow cytometry), koristeći poliklonska Anti-  
26 Chicken IgY (FITC konjugat) i monoklonska CD4 i CD8 (RPE konjugat) antitela

27  
28 U poglavlju **Materijal i metode** kandidat ističe da je svoja ispitivanja sproveo na 400  
29 jednodnevnih jedinki vrste *Gallus gallus domesticus*, Lohmann provenijencije. Jednodnevni  
30 komercijalni pilići lake linije su podeljeni u pet grupa (G1, G2, G3, G4 i G5) po 80 pilića i  
31 odgajani su po tehnologiji za datu provenijenciju do 70. dana starosti.

32 Dizajn eksperimenta: u inkubatorskoj stanici, prvog dana života, odmah nakon izleganja svih  
33 400 pilića je vakcinisano protiv infektivnog bronhitisa (Bioral H120) i atipične kuge živine  
34 (Avinew), sprej metodom. Pilići grupe G1 su vakcinisani protiv Gamboro bolesti, subkutano,  
35 vektorskom, vHVT13 vakcinom, dok je grupa G2 vakcinisana istom vakcinom samo  
36 intramuskularno. Sve grupe su takođe vakcinisane protiv Marekove bolesti, intramuskularno.  
37 Grupe G1 i G2 su vakcinisane Rispens CVI 988 vakcinom, a grupe G3, G4 i G5 Criomarex  
38 Rispens + HVT vakcinom.

39 Četnaestog dana ogleđa sve grupe pilića su vakcinisane protiv infektivnog bronhitisa i  
40 atipične kuge živine, dvovalentnom vakcinom, Nobilis IB Ma5+Clone 30, aerosol metodom.  
41 Imunizacija živim atenuiranim vakcinama protiv Gamboro bolesti grupe G3 i G4, izvršena je u  
42 optimalnom vremenu na osnovu visine utvrđenog titra maternalnih antitela jednodnevnih pilića,  
43 da bi se izbegla interferencija sa maternalnim antitelima. Grupa G3, je vakcinisana 28. dana  
44 peroralno, putem vode za piće, intermedijernom Nobilis Gumboro „D78“ vakcinom, a nakon 7  
45 dana revakcinisana istim sojem. Grupa G4 vakcinisana je 26. dana, intermedijernom plus  
46 Nobilis Gumboro „228E“ vakcinom, peroralno, putem vode za piće, a nakon 7 dana obavljena  
47 je revakcinacija, intermedijernom Nobilis Gumboro „D78“ vakcinom. Grupa G5 u toku ogleđa  
48 nije vakcinisana samo protiv infektivnog burzitisa (IBD), a ptice ove grupe su primile vakcine  
49 protiv infektivnog bronhiitsa, atipične kuge i marekove bolesti.

50 Imunizacija živim atenuiranim vakcinama protiv infektivnog bronhitisa (IB), Nobilis IB 4-91 i  
51 atipične kuge živine, Nobilis ND Clone 30, je ponovljena 42. dana ogleđa. Obe vakcine su  
52 aplikovne aerosol metodom.

53 **Uzorkovanje krvi za određivanje titra antitela** je vršeno 1., 14., 21., 28., 35., 48., 59 i 70.  
54 dana. Uzimani su uzorci krvi (po 10 uzoraka) iz svake eksperimentalne grupe, venepunkcijom  
55 *venae brachialis* i izdvajan je krvni serum. Nakon izdvajanja krvnog seruma ispitivano je  
56 prisustvo i visina titra antitela na Gamboro bolest, ELISA metodom primenom, dva kompleta  
57 kitova, Synbiotics IBD i Synbiotic IBD plus. Na kraju eksperimenta HI testom i ELISA testom  
58 urađen je titar specifičnih antitela na atipičnu kugu živine i infektivni bronhitis iz istih uzoraka

1 krvi pilića, radi upoređivanja serokonverzije na IB i atipičnu kugu živine kod različito  
2 vakcinisanih grupa pilića protiv infektivne burzalne bolesti.

### 3 **Uzorkovanje krvi za protočnu citometriju**

4 Uzorci pune krvi za protočnu citometriju uzimani su iz krilne vene (punkcijom v. *brachialis*)  
5 pomoću heparinske igle i šprica obloženog EDTA-antikoagulansom (BD Vacutainer®,  
6 Plymouth, Velika Britanija, 102 IJ litijum heparina). Uzorci su čuvani i transportovani do  
7 laboratorije na ledenim ulošcima horizontalno postavljeni u frižider torbu i stiroporom odvojeni  
8 od direktnog kontakta sa ledom. Laboratorijskim analizama se pristupilo u roku od 2 sata od  
9 momenta uzimanja uzoraka.

10 Tokom eksperimenta uzorkovana je puna periferna krv pilića u tri navrata: 28. dana ogleđa  
11 (pre obavljene vakcinacije živim atenuiranim vakcinama protiv IBD), 48. dana ogleđa (20 dana  
12 nakon vakcinacije živim atenuiranim vakcinama protiv IBD) i 59. dana ogleđa (11 dana nakon  
13 veštačke infekcije). Uzorkovana je puna krv od šest jedinki iz svake grupe pilića. Posle  
14 izdvajanja limfocita iz pune krvi limfo prep reagensom (FicolL-Hypaque, Sigma-Aldrich, SAD) i  
15 bojenja sa obeleženim monoklonskim i poliklonskim antitelima izvršeno je brojanje i utvrđen je  
16 T limfocitni odnos, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> pozitivnih ćelija krvi u sva tri termina uzorkovanja krvi.  
17 Procentualna zastupljenost imunoglobulina IgY klase (IgY B ćelije iz periferne krvi), protočnom  
18 citometrijom, utvrđivana je u dva termina 48. dana ogleđa (20 dana nakon vakcinacije živim  
19 atenuiranim vakcinama) i 59. dana ogleđa (11 dana nakon veštačke infekcije).

20 **Test veštačke infekcije** je urađen 48. dana, na po 10 jedinki iz svake grupe, s tim što je iz  
21 grupe G5, koja nije vakcinisana protiv Gamboro bolesti, izdvojeno 20 jedinki i od njih su  
22 formirane dve podgrupe, G5/A i G5/B, sa po 10 pilića u svakoj. Veštačka infekcija je urađena  
23 na svim pilićima (po 10 iz svih grupa) osim na pilićima podgrupe G5/B (nevakcinisani,  
24 neinficirani, izdvojeni na posebnu lokaciju). Veštačka infekcija je urađena intraokularno i  
25 intranasalno, davanjem po 50 µl pripremljenog inokuluma u nos i oko.

26 Pilići iz podgrupe G5/A, 59. dana ogleđa (11 dana nakon veštačke infekcije) korišćeni su za  
27 merenje mase burze i određivanje B/BR odnosa. Istovremeno, u tom terminu, pticama ove  
28 grupe (G5/A) su uzimani uzorci krvi u cilju pregleda limfocita, protočnom citometrijom. Sva  
29 uzorkovanja i pregledi u ostalim terminima ogleđa su vršeni na grupama pilića koje su  
30 označene od G1 do G5.

31 Prilikom uzorkovanja krvi, 14, 21, 35, 59 (11 dana nakon veštačke infekcije) i 70. dana,  
32 žrtvovano je po šest pilića u cilju patoanatomskog ispitivanja. Pre žrtvovanja izvršeno je  
33 merenje telesne mase pilića, a nakon žrtvovanja, ekstrakcija i merenje mase burze Fabrici,  
34 radi utvrđivanja vrednosti B/BR odnosa.

35 Za praćenje visine titara antitela protiv Gamboro bolesti i infektivnog bronhitisa, korišćena je  
36 ELISA metoda. Priprema uzoraka i sama procedura izvođenja testa obavljani su prema  
37 priloženom uputstvu proizvođača.

38 Očitavanje optičkih gustina uzoraka izvršeno je čitačem „Labsystems - Multiskan, MCC/340“,  
39 primenom kompjuterskog programa „MyLab v. 1.0“. Prevođenje dobijenih optičkih gustina u  
40 ELISA vrednosti antitela izvršeno je prema uputstvu proizvođača ELISA kita programom  
41 „xChek“ (Symbiotics Corporation, SAD).

42 Za praćenje visine titara antitela protiv atipične kuge živine korišćena je metoda inhibicije  
43 hemaglutinacije, HI testom prema OIE manual (OIE, 2012) koristeći virusni antigen atipične  
44 kuge živine (Deventer, Holandija).

### 45 **Identifikacija izolata virusa koji je korišćen za veštačku infekciju**

46 Za veštačku infekciju je korišćen vrlo virulentan soj virusa infektivne burzalne bolesti (vvIBDV)  
47 izolovan sa našeg područja - CH/99 (izolat koji potiče sa farme pilića u Vojvodini, 1999.  
48 godine) (pristupni kod u bazi gena: KF439863; GenBank accession number: KF439863).

49 Telesna masa pilića i masa burzi merena je na digitalnoj, tehničkoj vagi tačnosti 0,1g.

50 **Određivanje vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa“ (B/BR vrednosti)** je rađeno  
51 po formuli Sharma i sar. (1989) gde B/BR predstavlja rezultat deljenja mase burze Fabricii  
52 izražene u gramima sa telesnom masom pileta, trakođe izraženom u gramima, pomnožen sa  
53 1000.

54 Na osnovu vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa“ (B/BR vrednosti) određivan je  
55 stepen oštećenja Fabricijusove burze nakon vakcinacije (poređenje sa različitim vakcinama i  
56 načinima aplikacije) i veštačke infekcije virusom Gamboro bolesti.

57

1 **Određivanje vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“ (B/BI vrednosti) je rađeno**  
2 na osnovu formule koju su dali Lucio i Hitchner, 1979.

$$3 \\ 4 \text{ B/BR} \\ 5 \text{ BBI} = \frac{\text{B/BR}}{\text{B/BR kontrolne (G5) grupe}} \\ 6 \\ 7$$

8 **Protočna citometrija** je rađena tako što su uzorci pune nekoagulisane krvi homogenizovani, a  
9 nakon toga je pipetom odliveno po 1ml u polistirenske epruvete zapremine 5ml (12 x 75 mm,  
10 BD Science, Bedford, MA, SAD). Odliveni poduzorak krvi razređen je sa 1 ml PBS rastvora,  
11 kome je dodat 1% bovini serum albumin. Ovako razređena krv je zatim pažljivo pipetirana u  
12 polistirenske epruvete zapremine 5ml u kome se nalazilo 1,5 ml limfo prep reagensa (Ficoll-  
13 Paque) sa ciljem izdvajanja limfocita posle centrifugovanja (Boyum,1968).

14 Uzorci krvi su zatim centrifugirani (centrifuga Eppendorf 4564, Nemačka; 800 g) tokom 30  
15 minuta, a zatim je sloj ćelija iznad Fikolija koji zadržava limfocite, trombocite i krvnu plazmu i  
16 ostatke fikoli paqua pažljivo odliven pipetom sa nastavkom u polistirenske epruvete  
17 zapremine 5ml. Zahvaćeni supernatant je resuspendovan sa 4 ml PBS, a zatim centrifugiran  
18 na 800 g tokom 7 minuta radi uklanjanja trombocita i ostatka Ficoll paqua. Sediment je izuzet  
19 i ponovo resuspendovan sa 4 ml PBS i centrifugiranje na 400g tokom 7 minuta. Pročišćen  
20 supernatant (oko 1ml) je izdvojen u polistirenske epruvete zapremine 5ml. CD4<sup>+</sup> monoklonska  
21 antitela konjugovana sa FITC i RPE razređena su sa 1 ml PBS i u reakciji je korišćeno 10 µl,  
22 dok je anti-kuniđji IgY, nakon suspenzije sa 1 ml PBS-a, dodavan u količini od 1 µl. Inkubacija  
23 uzorka sa antitelima u mraku vršena je tokom 20 minuta, nakon čega je izvršeno ponovno  
24 centrifugiranje radi ispiranja viška fluorescentnog konjugata i nevezanih antitela (400g tokom  
25 7 minuta). Sediment je prenet u 1,5 ependorf epruvete i resuspendovan sa 1 ml PBS uz  
26 homogenizaciju na vorteksu. Čelije su analizirane na uređaju za protočnu citometriju Guava  
27 Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, California, SAD) sa 488nm argonskim laserom. U  
28 svim uzorcima je analizirano najmanje 10.000 čestica.

29  
30 U poglavlju **Rezultati** kandidat u pet odvojenih celina opisuje svoja zapažanja i vrednosti  
31 ispitivanih parametara u skladu sa zadacima.

32 U prvom poglavlju su prikazani rezultati testa veštačke infekcije, klinčke slike i  
33 patoanatomskog pregleda. Parametri koji su praćeni da bi se procenio efekat vakcinacije i  
34 veštačke infekcije su: prisustvo kliničkih znakova IBD, stopa mortaliteta i pato-morfološki  
35 nalaz. U grupi nevakcinisanih pilića, a veštački inficiranih (G5/A), teške kliničke znake IBD  
36 kao što su depresija, nakostrešenost perja i vodenasti proliv, imale su sve ptice, a pet od  
37 deset je uginulo. U obe grupe pilića vakcinisane živim atenuiranim vakcinama,  
38 intermedijernom i intermedijernom plus vakcinom protiv IBD (G3 i G4) po dve, od deset  
39 kokica su ispoljile kliničke znake bolesti i uginule. U grupama pilića koje su vakcinisane  
40 rekombinantnom vektorskom vakcinom vHVT13 (G1 i G2) i u kontrolnoj grupi (G5/B), koja nije  
41 bila vakcinisana i inficirana, nije bilo kliničkih znakova bolesti, niti uginuća pilića.

42 Na pato-morfološkom nalazu uginulih pilića posle veštačke infekcije zapažaju se krvarenja na  
43 muskulaturi grudi i nogu, edem burze Fabricii i povećani, bedi, kao kuvani bubrezi u G3, G4 i  
44 G5/A grupi. Tokom obdukcije krvarenja na Fabricijusovim burzama i na sluzokoži  
45 proventrikulusa ustanovljena su samo kod dva, od pet uginulih pilića, u grupi G5/A  
46 (nevakcinisana/inficirana). Posle veštačke infekcije makroskopske promene nisu zabeležene  
47 u grupama pilića vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom (G1 i G2), i u grupi pilića  
48 koji nisu vakcinisani i inficirani (G5/B).

49 Drugo poglavlje se odnosi na vrednosti odnosa „masa burze/telesna masa (BBR) i  
50 vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa (B/BI). Analizirajući prosečne B/BR vrednosti  
51 buzi Fabrici 14 dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa 1 (G1) imala  
52 najveće vrednosti (5,06±0,51), dok je najmanji indeks zabeležen kod G5 grupe (4,32±0,75).  
53 Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa  
54 (p>0,05). Analizom prosečnih BBR vrednosti burzi Fabricii 21 dana nisu ustanovljene  
55 signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa (p>0,05). Analizom  
56 prosečnih BBR vrednosti burzi Fabricii 35. dana eksperimenta ustanovljeno je da je  
57 eksperimentalna grupa G4 imala najmanju vrednosti (1,62±0,02), što je statistički vrlo  
58 značajno manje od prosečne vrednosti svih eksperimentalnih grupa (p<0,01).  
59 Eksperimentalna grupa G3 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od 3,10±0,19 statistički  
60 signifikantni je manja (p<0,01) od indeksa za grupe G1, G2, i G5. Nisu ustanovljene

1 signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa G1 i G5 ( $p > 0,05$ ).  
2 Kod svih eksperimentalnih grupa ustanovljena su minimalna variranja. Analizom prosečnih  
3 vrednosti indeksa burzi Fabricii 59. dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna  
4 grupa G5/B imala najveću vrednost ( $5,33 \pm 1,02$ ), što je statistički vrlo značajno veće od  
5 prosečne vrednosti svih eksperimentalnih grupa ( $p < 0,01$ ) izuzev grupe G2 gde je ta razlika  
6 značajno veća ( $p < 0,05$ ). Eksperimentalna grupa G2 sa prosečnom vrednošću indeksa burze  
7 od  $4,12 \pm 0,55$  statistički signifikantno je veća ( $p < 0,01$ ) od indeksa za grupe G3, G4, i G5/A, a  
8 nije ustanovljena značajnost razlika sa grupom G1 ( $p > 0,05$ ). Eksperimentalna grupa G1 sa  
9 prosečnom vrednošću indeksa burze od  $3,50 \pm 0,20$  statistički signifikantno je veća ( $p < 0,01$ ) od  
10 indeksa za grupe G3, G4 i G5/A. Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih  
11 vrednosti eksperimentalnih grupa G3 i G4, G5/A, kao i između G4 i G5/A ( $p > 0,05$ ). Analizom  
12 prosečnih vrednosti indeksa burzi fabrici 70 dana eksperimenta ustanovljeno je da je  
13 eksperimentalna grupa G5 imala najveće vrednosti ( $4,76 \pm 0,35$ ) što je statistički vrlo značajno  
14 veće od prosečne vrednosti eksperimentalnih grupa G2, G3 i G4 ( $p < 0,01$ ). Eksperimentalna  
15 grupa G1 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od  $4,65 \pm 0,51$  statistički signifikantno je  
16 veća ( $p < 0,01$ ) od indeksa za grupe G2, G3, i G4. Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu  
17 ustanovljene signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica  
18 homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G3 eksperimentalne grupe (101,47%).

19 Nakon veštačke infekcije masa burzi i vrednosti BBI značajno se smanjuju u grupi  
20 nevakcinisanih, a inficiranih pilića (G5/A) i u grupama pilića vakcinisanih živim atenuiranim  
21 vakcinama (G3 i G4), kod kojih je došlo do pojave atrofije burzi BBI su iznosili 0,29; 0,23 i  
22 0,13 za grupe G3, G4 i G5/A respektivno.

23 **Treće poglavlje dela Rezultati** se odnosi na visinu ELISA titrova specifičnih antitela protiv  
24 IBDV-a, koji su dobijeni upotrebom dva različita (klasičan i unapređen) imunoenzimski  
25 (ELISA) metoda.

26 Pilići grupe G1 i G2 vakcinisani vektorskom rekombinantnom vHVT13 vakcinom imali su  
27 niske titrove specifičnih antitela, korišćenjem klasičnog ELISA IBD testa. U grupi G1 titar  
28 antitela se kretao od 825, 21. dana, do 2524 sedamdesetog dana, a u grupi G2 od 659 do  
29 2061. Određivanje titra antitela unapređenim ELISA IBD plus testom je pokazalo znatno veće  
30 titrove antitela. U grupi G1 titar antitela se kretao od 6831, dvadeset prvog dana do 11.283  
31 sedamdesetog dana, a u grupi G2 od 5097 do 10.9701. Nasuprot tome, pilići vakcinisani  
32 živim atenuiranim vakcinama protiv IBD-a (G3 i G4) imali su visoke titrove antitela merene sa  
33 oba testa posle pete, odnosno šeste nedelje. Korišćenjem klasičnog ELISA IBD testa grupa  
34 G3 35. dana starosti je imala titar od 1160 do 5515 sedamdesetog dana starosti, a grupa G4  
35 35. dana starosti je imala titar od 2352 do 6.517 sedamdesetog dana starosti. Korišćenjem  
36 unapređenog ELISA IBD plus testa grupa G3 35 dana starosti je imala titar od 4951 do 7931  
37 sedamdesetog dana starosti, a grupa G4 35. dana starosti je imala titar od 3247 do 8853  
38 sedamdesetog dana starosti.

39 Veštački inficirani pilići iz svih grupa imali su značajno povećanje titra antitela mereno  
40 klasičnim IBD ELISA testom, a najniži titrovi antitela su i dalje zabeleženi u grupama G1 i G2  
41 koje su vakcinisane rekombinantnom vHVT13 vakcinom.

42 Brza serokonverzija utvrđena je 11 dana nakon veštačke infekcije. Klasičnim ELISA IBD  
43 testom, najviši porast prosečnog titra antitela 8828 izmeren je kod pilića izdvojenih iz grupe  
44 G5/A (nevakcinisani, veštački inficirani, zatim slede pilići iz G3, sa prosečnim titrom 8312  
45 (intermedijerna vakcina), pa zatim grupe G4, prosečni titar 7087 i najmanji porast titra u  
46 grupama G1 i G2 (rekombinantna vHVT13, subkutano i intramuskularno) 3247 i 3513  
47 respektivno.

48 Titar antitela meren unapređenim ELISA IBD plus testom je od 14 dana bio signifikantno viši  
49 ( $p < 0,01$ ) u G1 i G2 grupama vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, u odnosu na  
50 G3 i G4 koje su imunizovane atenuiranim živim vakcinama protiv IBD-a.

51 **Četvrto poglavlje dela Rezultati** se odnosi na prikaz rezultata visine titra antitela na atipičnu  
52 kugu živine (HI test) i rezultata visine titra antitela na infektivni bronhitis (ELISA test)  
53 sedamdesetog dana ogleđa. Analizirajući prosečne vrednosti 70 dana eksperimenta  
54 ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G3 imala najvišu vrednost HI titra  
55 ( $121,60 \pm 76,62$ ), dok je najniža vrednost zabeležena kod G2 grupe ( $73,60 \pm 40,05$ ). Nisu  
56 ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti titra antitela rađenih HI testom  
57 između eksperimentalnih grupa ( $p > 0,05$ ). Unutar svih eksperimentalnih grupa uočene su  
58 varijacije, koje su bile najveće kod G5 eksperimentalne grupe (72,84%). Analizirajući  
59 prosečne vrednosti visine titra antitela na IB (ELISA test) 70. dana ogleđa ustanovljeno je da  
60 je eksperimentalna grupa G5 imala najveće vrednosti ( $4866 \pm 902,10$ ), dok je najmanja

1 vrednost zabeležena kod grupe G4 (3647±584,60). Samo između ove dve grupe ustanovljene  
2 su signifikantne razlike ( $p < 0,05$ ). Između ostalih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike  
3 ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije,  
4 zabeleženo je kod G1 eksperimentalne grupe (24,56%). Značajna razlika u visini titra  
5 specifičnih antitela na IB utvrđena je između grupe G4 i G5. Grupa pilića, G4 imunizovana  
6 atenuiranim živom vakcinom (intermedijerni plus soj) protiv IBD živine ima značajno niži titar  
7 antitela na IBV ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu G5 grupu. Između ostalih grupa nema  
8 značajne razlike.

9 Rezultati humoralnog imunskog odgovora koji su mereni 70. dana ogleđa, analizirani su po  
10 grupama, radi upoređenja serokonverzije na IB i atipičnu kugu živine kod različito  
11 vakcinisanih grupa pilića protiv infektivne burzalne bolesti.

12 **Peto poglavlje dela Rezultati** se odnosi na rezultate procentualne zastupljenosti  
13 imunoglobulina klase Y i  $CD4^+/CD8^+$  T limfocita u perifernoj krvi pilića.

14 Merenje imunoglobulina IgY u perifernoj cirkulaciji pilića vršeno je u dva termina. Prvo  
15 merenje izvršeno je 48. dana ogleđa (20 dana nakon vakcinacije pilića grupe G3 i G4 živim  
16 atenuiranim vakcinama protiv IBD), a drugo merenje 59. dana ogleđa (11 dana nakon  
17 veštačke infekcije). Analizirajući prosečne vrednosti procentualne zastupljenosti  
18 imunoglobulina IgY 48. dana ogleđa ustanovljeno je da su eksperimentalne grupe imale  
19 veoma ujednačene vrednosti. Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih  
20 vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija između grupa ( $p > 0,05$ ). Koeficijent varijacije za  
21 ovaj parametar je bio izuzetno nizak i kretao se od 1,85% kod eksperimentalne grupe G1 do  
22 4,62% kod grupe G5, što ukazuje da su vrednosti u ispitivanim eksperimentalnim grupama  
23 bile ujednačene. Analizirajući prosečne vrednosti procentualne zastupljenosti imunoglobulina  
24 IgY 59. dana ogleđa ustanovljeno je da su eksperimentalne grupe imale veoma ujednačene  
25 vrednosti, a najmanja prosečna vrednost zabeležena je u G2 grupi (92,56±3,11), dok je  
26 najveća zabeležena u G5/A grupi (94,59±1,41). Nisu ustanovljene signifikantne razlike  
27 između prosečnih vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija između grupa ( $p > 0,05$ ).  
28 Koeficijent varijacije za ovaj parametar je bio izuzetno nizak i kretao se od 1,49% kod  
29 eksperimentalne grupe G5 do 3,36% kod G2 grupe, što ukazuje da su vrednosti u ispitivanim  
30 eksperimentalnim grupama bile ujednačene bez velikog variranja.

31 Analizom prosečnih vrednosti odnosa  $CD4^+ / CD8^+$  T limfocita ustanovljeno je da je  
32 eksperimentalna grupa G4 imala najnižu vrednosti (1,76±0,15), što je statistički vrlo značajno  
33 manje ( $p < 0,01$ ) od prosečne vrednosti grupa G1, G2, i G5. Eksperimentalna grupa G3 sa  
34 prosečnom vrednošću od 1,95±0,14 statistički signifikantno je manja ( $p < 0,01$ ) od vrednosti za  
35 grupe G1 i G5. Prosečna vrednost grupe G2 (2,63±0,26) značajno ( $p < 0,05$ ) je veća od  
36 prosečne vrednosti grupe G3. Između ostalih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike  
37 ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije,  
38 zabeleženo je kod G1 eksperimentalne grupe (17,64%).

39 U poglavlju **Diskusija**, kandidat kritički razmatra dobijene rezultate i upoređuje ih sa  
40 podacima iz literature uz odgovarajuće tumačenje uočenih odstupanja i razlika, da bi nakon  
41 toga izveo zaključke koje je sistematizovao prema postavljenim zadacima. Tekst disertacije  
42 se završava poglavljem **literatura** koje sadrži 207 referenci.

## 46 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 47 disertaciji):

49 Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz literature, može se zaključiti sledeće:

- 51 1. Na osnovu praćenja kliničkih znakova i mortaliteta pilića nakon veštačke infekcije  
52 vIBDV, potpuna zaštita je postignuta kod grupa G1 i G2 koje su vakcinisane  
53 rekombinantnom vHVT13 vakcinom protiv infektivne burzalne bolesti, a delimična,  
54 kod pilića u G3 i G4 grupi vakcinisanih intermedijernom ili intermedijernom plus  
55 vakcinom protiv infektivne burzalne bolesti.

- 1 2. Nakon veštačke infekcije nisu uočene patoanatomske promene u grupama pilića  
2 vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom (G1 i G2), dok su u grupama G3 i  
3 G4 vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama uočene patoanatomske promene  
4 tipične za infektivnu burzalnu bolest samo kod uginulih jedinki.  
5
- 6 3. Vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa-BBR i BBI indeksa“, nakon vakcinacije,  
7 nakon veštačke infekcije i na kraju eksperimenta, kod G3 i G4 grupe pilića  
8 vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti su bile  
9 statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na grupe pilića G1 i  
10 G2 vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, što ukazuje na to da je nakon  
11 veštačke infekcije stepen oštećenja i atrofije burze Fabricii znatno manje izražen kod  
12 grupa pilića imunizovanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, ali da i dalje postoji  
13 delimična atrofija.  
14
- 15 4. Određivanjem titra antitela na virus infektivne burzalne bolesti i njihovih prosečnih  
16 vrednosti u svim terminima uzorkovanja krvi, određivanih IBD plus ELISA testom  
17 („unapređena ELISA“), utvrđeno je da su G1 i G2 grupe pilića vakcinisanih  
18 rekombinantnom vHVT13 vakcinom imale značajno veće vrednosti ( $p < 0.01$ ) u odnosu  
19 na vrednosti titra antitela G3 i G4 grupe pilića vakcinisanih živim atenuiranim  
20 vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti, što je dokaz bolje imunogenosti  
21 rekombinantne vHVT13 vakcine.  
22
- 23 5. U četvrtoj nedelji starosti uočava se pad titra antitela protiv infektivne burzalne bolesti  
24 određivanih klasičnim i „unapređenim“ IBD plus ELISA testom, kod pilića vakcinisanih  
25 živim atenuiranim vakcinama protiv IBD, što nije ustanovljeno kod pilića vakcinisanih  
26 rekombinantnom vHVT13 vakcinom, što predstavlja dokaz uspešnog prevazilaženja  
27 opadanja specifičnih antitela nakon imunizacije rekombinantnom vHVT13 vakcinom.  
28
- 29 6. Rekombinantna vHVT13 vakcina protiv IBD nije suprimirala imunski odgovor nakon  
30 imunizacije pilića protiv atipične kuge žiivne i infektivnog bronhiitsa, jer nije  
31 ustanovljena značajna razlika prosečnih vrednosti titra antitela na atipičnu kugu živine  
32 ( $p > 0,05$ ).  
33
- 34 7. Određivanjem koncentracije imunoglobulina klase Y (IgY) nije bilo statistički značajnih  
35 razlika između grupa ni nakon vakcinacije protiv IBD, niti nakon veštačke infekcije.  
36
- 37 8. Određivanjem prosečnih vrednosti pozitivnih  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita i njihovog  
38 međusobnog odnosa nakon vakcinacije protiv IBD ustanovljeno je da su te vrednosti  
39 statistički značajno niže kod grupa pilića imunizovanih atenuiranim živim vakcinama,  
40 u odnosu na vrednosti kod grupa pilića imunizovanih, rekombinantnom, vHVT13



1 vakcinom i kod nevakcinisane grupe pilića, na osnovu čega se može zaključiti da je  
2 došlo do delimične supresije celularnog imunskog odgovora nakon imunizacije  
3 rekombinantnom vHVT13 vakcinom, ali u manjem stepenu u odnosu na supresiju  
4 izraženu kod pilića imunizovanih živim atenuiranim vakcinama.

- 5  
6 9. Nakon veštačke infekcije vvIBD virusom prosečan odnos  $CD4^+$  /  $CD8^+$  T limfocita u  
7 perifernoj krvi pilića je kod svih grupa statistički značajno snižen, bez značajnih  
8 razlika između grupa, indikujući smanjenje imunokompetencije bez obzira na način  
9 vakcinacije protiv IBD.

10  
11  
12 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**  
13 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**  
14 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

15 Rezultati su prikazani jasno i razumljivo u skladu sa ciljevima i zadacima, sva odstupanja su  
16 upoređivana sa rezultatima drugih autora i pravilno su protumačena, pri čemu su zaključci  
17 zasnovani na dobijenim rezultatima i usklađeni sa postavljenim zadacima.

18  
19  
20 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

21  
22 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**  
23 Disertacija je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

24  
25 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**  
26 Disertacija sadrži sve bitne elemente propisane za završenu doktorsku tezu.

27  
28 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

29 Doktorska disertacija magistra Miroljuba Dačića dala je originalan doprinos nauci i struci  
30 budući da dobijeni rezultati u potpunosti opravdavaju cilj i zadatke jer je prvi put na teritoriji  
31 Republike Srbije primenjena rekombinantna vektorska vakcina protiv infektivne burzalne  
32 bolesti živine, u cilju imunoprofilakse živine koja se gaji u industrijskim uslovima. Humoralni  
33 imunski odgovor je praćen ne samo klasičnim testovima već i primenom znatno osetljivijih  
34 imunoenzimskih (unapređenih) metoda (ELISA), koji omogućavaju bolje praćenje imunskog  
35 odgovora posle vakcinacije rekombinantnim vektorskim vakcinama. Metodom protočne  
36 citometrije praćena je ekspresija  $CD4$  i  $CD8$  T limfocita iz periferne krvi što se veoma retko  
37 radi kod živine, tako da postoji samo par autora koji su se bavili ovom problematikom kod  
38 ptica. Kako  $CD4$  i  $CD8$  limfociti imaju veoma važnu ulogu u regulaciji i kontroli mnogih  
39 patogena, pre svega virusnih, ova istraživanja su veoma značajna, naročito za  
40 imunosupresivne virusne bolesti. Iz ove doktorske disertacije proističu i smernice za  
41 tumačenje rezultata nakon imunoprofilakse kod infektivne burzalne bolesti.

42  
43 **IX PREDLOG:**

44  
45 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**  
46 **ponuđenih mogućnosti):**

- 47 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

1 DATUM  
2 06.02.2018.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

---

Dr Miroslav Valčić  
Redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

---

Dr Maja Velhner  
Naučni savetnik  
Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad

---

Dr. Milorad Mirilović  
Vanredni profesor  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu