

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

6  
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

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

10 26. 09. 2018. године, Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине  
11 Универзитета у Београду на 188. седници.

12  
13 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**  
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**  
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

16  
17 1. Др Јевросима Стевановић, ванредни професор, Биологија, 2015, Факултет  
18 ветеринарске медицине, Универзитет у Београду (ментор 1);

19  
20 2. Др Милорад Мириловић, ванредни професор, Ветеринарска економика, 2014,  
21 Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду (ментор 2);

22  
23 3. Др Зоран Станимировић, редовни професор, Биологија-генетика, 2007, Факултет  
24 ветеринарске медицине, Универзитет у Београду (члан Комисије);

25  
26 4. Др Невенка Алексић, редовни професор, Паразитске болести, 2004, Факултет  
27 ветеринарске медицине, Универзитет у Београду (члан Комисије);

28  
29 5. Др Драган Ћирковић, доцент, Пољопривредна производња, 2011, Департман за  
30 хемијско технолошке науке, Државни Универзитет у Новом Пазару (члан  
31 Комисије).

32  
33  
34 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

35  
36 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

37 Бранислав, Сава, Вејновић

38  
39 **2. Датум рођења, општина, Република:**

40 12. 01. 1989, Сремска Митровица, Србија

41  
42 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе\*:**

43  
44 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука\*:**

45  
46 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

47  
48 **„Молекуларно-генетичка идентификација трипанозоме *Lotmaria passim* Schwarz,**  
49 **2014 и анализа њених ефеката на здравље пчелињих заједница и економске**  
50 **ефекте у пчеларству“**

51  
52 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**  
53 **шема, графикана и сл.):**

54  
55 Докторска дисертација кандидата Бранислава Вејновића написана је на 116  
56 страна и обухвата следећа поглавља: Увод (2 стране), Преглед литературе (20 страна),  
57 Циљ и задаци истраживања (1 страна), Материјал и методе (24 стране), Резултати  
58 истраживања (35 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (2 стране), Литература (18  
59 страна). Насловне стране докторске дисертације које обухватају назив на српском и  
60 енглеском језику, имена ментора и чланова Комисије, захвалницу, сажетак на српском и

1 енглеском језику и садржај дати су на првих 8 страна које нису нумерисане. У оквиру  
2 дисертације постоји 15 табела, 11 слика и 20 графикана. Након литературе приложена  
3 је биографија кандидата, изјава о ауторству, изјава о истоветности штампане и  
4 електронске верзије рада и изјава о коришћењу (нису нумерисане).  
5

6 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**  
7 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до**  
8 **500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-**  
9 **није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка**  
10 **референци-навести број референци у докторској дисертацији):**  
11

12 У поглављу **Увод** наведен је значај очувања здравих и јаких пчелињих  
13 заједница, описан је утицај паразитских трипанозома и микроспоридија на економски  
14 значајне опрашиваче, укључујући медоносну пчелу. Објашњена је потреба за  
15 благовременом и прецизном дијагностиком новоописаног пчелињег паразита *Lotmaria*  
16 *passim* Schwarz, 2014, трипанозоме за коју постоје индиције да утиче на здравље пчела  
17 и да доприноси великим губицима гајених пчела широм света. Наиме, након недавног  
18 описа врсте *L. passim* испоставило се да она преовлађује код *A. mellifera*, као и да је  
19 већина трипанозома раније налажених код пчела арбитарно означавана као *Crithidia*  
20 *mellificae*. Објашњено је да су *C. mellificae* и *L. passim* морфолошки веома сличне, те је  
21 зато анализа њихове ултраструктуре путем скенирајуће и трансмисионе електронске  
22 микроскопије недовољна за њихову прецизну идентификацију, због чега је неопходна  
23 додатна анализа њихове ДНК. Обзиром да је постојећа методологија ДНК  
24 идентификације *C. mellificae* и *L. passim* захтевала обавезно секвенционирање,  
25 наглашено је да је би развој PCR методе за разликовање наведених врста без  
26 секвенционирања обезбедио лакше и брже рутинско испитивање њиховог присуства, а  
27 самим тим и њиховог утицаја на здравље пчелињих заједница и економске ефекте у  
28 пчеларству. Истакнуто је у да би успостављање *real-time* PCR методе за истовремену  
29 идентификацију и квантификацију пчелињих трипанозома, омогућило утврђивање  
30 степена и динамике инфекције присутних трипанозома и процену квантитативног  
31 односа између трипанозома и других патогена који се истовремено могу пронаћи код  
32 медоносне пчеле и утичу на кондицију и продуктивност пчелињих друштава.

33 У поглављу **Преглед литературе** истакнут је значај гајења медоносне пчеле уз  
34 навођење литературних података о економском ефекту које пчеле остварују  
35 опрашивањем пољопривредних усева. Цитирани су радови у којима се наводе подаци о  
36 губицима пчелињих друштава и наведени резултати великог броја истраживања  
37 спроведених у циљу утврђивања узрока тих губитака током последње деценије, како у  
38 свету, тако и код нас. Наведен је и став, прихваћен у научном свету, да се у основи  
39 губитака пчелињих друштава налази хронична изложеност мултиплим стресорима (а то  
40 су патогени микроорганизми, паразити и штеточине пчела, изложеност пестицидима,  
41 смањена пчелиња паша и лоша пчеларска пракса) који међусобно интерагују или делују  
42 синергистички. Из описа резултата истраживања спроведених током последње  
43 деценије уочава се да се као најчешћи узроци зимских губитака пчелињих друштава  
44 наводе паразити медоносне пчеле. У складу са темом докторске дисертације, дат је  
45 детаљан опис трипанозома и наведени су литературни подаци о њиховом негативном  
46 утицају на понашање, физиологију, издржљивост, имуни систем и преживљавање  
47 бумбара и других значајних инсеката полинатора из реда Hymenoptera. Наведено је да  
48 су код медоносне пчеле до сада утврђене две врсте паразитских трипанозома, прва  
49 *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, 1967, која је описана пре скоро пет деценија и  
50 друга, *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 која је недавно описана и о којој има веома мало  
51 података. Какдидат је објаснио зашто су бројни литературни подаци о присуству *C.*  
52 *mellificae* у пчелама из Америке, Швајцарске, Кине, Јапана, Шпаније, Турске и Белгије  
53 били непрецизни. Наиме, пре описа *L. passim*, детекција трипанозома код медоносне  
54 пчеле у свим истраживањима тумачена је као налаз *C. mellificae*, али недавне анализе  
55 ДНК секвенци обе врсте показале су да је у свим тим случајевима била реч о врсти *L.*  
56 *passim* и да је она заправо била доминантна трипанозома у пчелињим заједницама  
57 широм света, а не *C. mellificae*, како се раније сматрало. У складу са тим открићем,  
58 ретроактивно је утврђено да су губици пчела у Америци и Белгији, иницијално  
59 протумачени као последица паразитизма врстом *C. mellificae*, заправо били изазвани  
60 врстом *L. passim*, што је покренуло повећано интересовање за испитивањем

1 распрострањености и утицаја овог паразита за здравље медоносне пчеле и економске  
2 ефекте у пчеларству. У наставку је објашњено да се постојећа метода за разликовање  
3 *S. mellificaе* и *L. passim* заснива на амплификацији ITS региона који је варијабилан  
4 (33,5-35,3% интерспецијски и 2% интраспецијски) и приближно исте величине (~140 бп)  
5 код обе врсте због чега не обезбеђује њихову дискриминацију путем електрофорезе,  
6 него захтева секвенционирање. Осим тога, у случају мешовите инфекције долази до  
7 преклапања ампликона ове две врсте, као и преференцијалне амплификације ДНК  
8 врсте која је више заступљена у узорку или оне врсте која има мање полиморфизама  
9 због чега се прајмери боље подударају. Наведени су постојећи подаци који указују на  
10 негативни синергистички ефекат *Varroa destructor*, *N. ceranae* и *S. mellificaе* на пчеле и  
11 истакнуто одсуство података о присуству, распрострањености и утицају трипанозома на  
12 пчеле у већини европских земаља, укључујући Србију.

13 У поглављу **Циљ и задаци истраживања** наведено је да је циљ био  
14 молекуларна идентификација трипанозоме *Lotmaria passim* и испитивање њеног утицаја  
15 на здравље пчелињих заједница и економске ефекте у пчеларству. Наведени су и  
16 следећи задаци за остваривање наведеног циља:

- 17 1. Успостављање конвенционалне PCR методе за идентификацију врста пчелињих  
18 трипанозома *Lotmaria passim* и *Crithidia mellificaе* коришћењем новодизајнираних  
19 прајмера (без потребе за секвенционирањем ампликона).
- 20 2. Ретроспективна анализа узорака пчела из деветогодишњег периода (2007-2015) на  
21 присуство трипанозома.
- 22 3. Успостављање *real-time* PCR методе за утврђивање степена инфестације пчела  
23 трипанозомама.
- 24 4. Добијање првих информација о утицају присутних трипанозома на јачину и  
25 здравствено стање пчелињих заједница и економске ефекте у пчеларској  
26 производњи.
- 27 5. Економска евалуација израђених модела за смањивање броја инфеката у пчелињим  
28 друштвима.

29 У поглављу **Материјал и методе** описан је поступак *in vivo* клонирања  
30 рекомбинантних плаزمида у сврху добијања позитивних контрола за PCR детекцију *S.*  
31 *mellificaе* и *L. passim*. Позитивне контроле су развијене како би се обезбедила контрола  
32 квалитета PCR тестова и формирале стандардне криве познате концентрације за *real-*  
33 *time* PCR. За потребе клонирања, најпре су од чистих референтних ћелијских култура  
34 *L. passim* (сој BRL) и *S. mellificaе* (сој 30862) направљени рекомбинантни плазмиди  
35 (pGEM-T Easi; Promega) који садрже ампликоне наведених врста. Плазмидни  
36 конструкти су конструисани инсекцијом гена специфичних за врсте *Crithidia mellificaе* и  
37 *Lotmaria passim* у „pGEM®-T Easy Vektor“ (Promega), а затим су клонирани у сојевима *E.*  
38 *coli* DH5а. Након тога су дизајнирани прајмери за *L. passim*: LpCytb\_F1 (5'-  
39 cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC-3') и LpCytb\_R (5'-gcCAaAcACCaATaACTGGtACT-3') и за  
40 *S. mellificaе*: CmCytb\_F (5'-AGTtTGAgCtGTtGGaTTTgTt-3') и CmCytb\_R (5'-  
41 AACcATtAcAGGcACgTTGC-3') и оптимизован протокол за конвенционални PCR  
42 (иницијална денатурација на 95°C током 2 min, затим 40 циклуса у којима се понављају:  
43 денатурација на 95°C у трајању од 30 sec, хибридизација на 55°C током 30 sec и  
44 екстензија прајмера на 72°C током 20 sec, након које следи финална елонгација на 72°C  
45 у трајању од 2 min. За дизајн прајмера коришћен је полиморфни регион cytochrome b  
46 гена (*Cytb*) претходно валидираних трипанозома *L. passim* (GenBank KJ684960) и *S.*  
47 *mellificaе* (GenBank KJ684951). Током верификације прајмера провера  
48 трипанозоматидне ДНК у испитиваним узорцима је рађена са претходно објављеним  
49 универзалним трипанозоматидним прајмерима. Молекуларно генетичка  
50 идентификација *L. passim* и *S. mellificaе* обухватила је следеће кораке: (а) изолацију  
51 ДНК присутних трипанозома из мацерата пчела помоћу комерцијалног сета „DNeasy  
52 Plant Mini Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Germany); (б) PCR коришћењем комерцијалног  
53 сета „KAPA Taq PCR Kit“ (KAPA Biosystems, MA, USA) и прајмера за LpCytb\_F1 и  
54 LpCytb\_R за *L. passim* на апарату „Mastercycler Personal“ (Eppendorf, Germany); (ц) PCR  
55 коришћењем комерцијалног сета „KAPA Taq PCR Kit“ (KAPA Biosystems, MA, USA) и  
56 прајмера CmCytb\_F и CmCytb\_R за *S. mellificaе* на апарату „Mastercycler Personal“  
57 (Eppendorf, Germany); (д) наношење PCR продуката на 1,5% агарозном гелу за *L.*  
58 *passim* или на 1,8% агарозном гелу за *S. mellificaе*, гелови су раздвајани на апарату за  
59 електрофорезу „MUPID ONE electrophoresis unit MU2“ (Nippon Genetics, Japan), а затим  
60 обојени етидијум бромидом и посматрани под UV светлом на трансилуминатору „UV

1 Table manual ETX-20.C“ (Vilber Lourmat, Germany). Након успешне верификације  
2 прајмера и успостављања описане методе PCR детекције, обављено је испитивање  
3 присуства *C. mellificaе* и *L. passim* у архивским узорцима ДНК изолованим из пчела  
4 сакупљених са 57 различитих локалитета у Србији у протеклом деветогодишњем  
5 периоду (2007-2015). Обзиром да је само *L. passim* потврђена у тим узорцима, само је  
6 за ту врсту успостављана метода *real-time* PCR квантификације у наставку овог  
7 истраживања. За ту сврху, најпре су дизајнирани и верификовани прајмери за *real-time*  
8 PCR детекцију *L. passim*. Специфичан *forward* прајмер је оптимизован за квантитативни  
9 PCR (LpCytb\_F2: 5'-AGTaTGAGCaGTaGGtTTTaTTATa-3') и дизајниран да са *reverse*  
10 прајмером LpCytb\_R (5'-gcCAaAcACCaATaAcTGGtAcT-3') умножи 146 бп из региона  
11 *cytochrome b* гена (Cytb, GenBank KJ684960). За амплификацију и квантификацију ДНК  
12 *L. passim* коришћен је комерцијални сет „KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit“ (KAPA  
13 Biosystems, MA, USA). Реакције су изведене на *real-time* PCR апарату „Rotor-Gene Q  
14 5plex“ (Qiagen, Валенсија, СА) при следећем температурном протоколу: иницијална  
15 денатурација у трајању од 10 минута на 95°C, затим 40 циклуса денатурације од 10  
16 секунди на 95°C и 60 секунди хибридације и екстензије на 54°C. Стандарди су  
17 коришћени у серијским разблажењима од  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^4$  плазмидне ДНК.

18 За потребе процене утицаја *L. passim* на пчелиње друштво обављен је теренски  
19 експеримент који је обухватио одабир 20 пчелињих друштава (10 са *L. passim* и 10 без  
20 *L. passim*), процену јачине пчелињих друштава према броју одраслих пчела, количини  
21 легла (отвореног и затвореног) и хране (перге и меда), а затим уједначавање по јачини  
22 тих 20 друштава за експеримент, као и замену постојећих матица оплођеним сестрама  
23 матицама код свих 20 друштава пре почетка експеримента. Месечно узорковање пчела  
24 излетница обављено је у периоду март 2016 – март 2017 (укупно 8 пута) ради  
25 квантификације ДНК *L. passim* и процене степена инфекције код 10 *L. passim*-  
26 позитивних друштава (*real-time* PCR), провере присуства ДНК *L. passim* код 10 друштава  
27 која су при иницијалној провери (конвенционални PCR) била *L. passim*-негативна и ради  
28 анализе присуства спора микроспориције *Nosema sp.* према препорукама OIE (2013).

29 За анализу параметара оксидативног стреса, односно активности антиоксидативних  
30 ензима: супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT) и глутатион С-трансферазе (GST)  
31 и концентрације малондиалдехида (MDA) узорковане су пчеле из свих 20 пчелињих  
32 друштава два пута (у јуну и у септембру 2016. године). Најмање 20 пчела излетница је  
33 узорковано са лета сваке кошнице, смештено у стерилне пластичне посуде и на сувом  
34 леду транспортовано до лабораторије. Одмах по доласку у лабораторију обављено је  
35 мацерирање пчела а затим спектрофотометријско одређивање активности  
36 антиоксидативних ензима SOD на 480 nm, CAT на 240 nm коришћењем H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> као  
37 супстрата и GST на 340 nm коришћењем 1-хлоро-2,4-динитробензена (DTNB), као и  
38 испитивање концентрације MDA у реакцији са тиобарбитурном киселином.  
39 Спектрофотометријске анализе обављане су на апарату UV/VIS Spectrophotometer BK-  
40 36 S390 (BIOBASE).

41 Процена јачине свих 20 пчелињих друштава обављана је три пута: у марту, јуну  
42 и септембру 2016. године одређивањем следећих параметара: површине легла  
43 (отвореног и затвореног), површине саћа са храном (површина саћа са медом,  
44 површине саћа са пергом) и бројности пчела у друштву. Мерење продуктивности,  
45 односно приноса меда свих пчелињих друштава обављено је мерењем количине  
46 извртаног меда у 2016. години. Такође, током истраживачког периода бележена је и  
47 просечна месечна температура у Вишњићеву (општина Шид), где су били стационирани  
48 пчелињаци, при чему није узет у обзир зимски период (октобар-фебруар).

49 Статистичка анализа обухватила је процену разлика учесталости инфекције са  
50 *L. passim* и *N. ceranae* путем *Fisher exact* теста. За поређење две групе хомогених  
51 података (коэффициент варијације (cv) <30%) примењен је *t* тест за независне узорке, у  
52 супротном је примењен *Mann-Whitney U-test*. Хетерогени подаци (cv>30%) у групи која је  
53 имала поновљено мерење су поређени помоћу *t* теста за зависне узорке, у супротном је  
54 примењен *Wilcoxon matched pairs* тест. За поређење више од две групе хомогених  
55 података (cv<30%) примењена је или двофакторска анализа варијансе, или  
56 једнофакторска анализа варијансе за поновљено мерење и у једном и у другом случају  
57 накнадна поређења су урађена са *Tuckey* тестом. Нумерички подаци за хомогене  
58 скупове података приказани су као средња вредност ± стандардна девијација, а за  
59 хетерогене скупове података као медијана са одговарајућим интерквартилним опсегом  
60 (IQR: 25-75 перцентила). Економска евалуација урађених модела за смањење броја

1 инфеката у пчелињим друштвима изведена је анализом тошкова и добити. За  
2 статистичку анализу коришћени су софтвери GraphPad Prism верзија 6.0 (GraphPad,  
3 San Diego, CA, USA) и Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

4 Поглавље **Резултати** обухвата прегледно и јасно приказане резултате  
5 подељене у три поглавља. У првом поглављу дати су резултати који указују на успешно  
6 постигнут први циљ, односно успостављање конвенционалне PCR методе за  
7 индентификацију врста пчелињих трипанозома *L. passim* и *C. mellificaе* коришћењем  
8 новодизајнираних прајмера (без потребе за секвенционирањем ампликона). Пар  
9 прајмера специфичних за *L. passim* (LpCitb\_F1 + LpCitb\_R) окружује регион ДНК који  
10 садржи 13 полиморфних места јединствених за ову врсту у поређењу са *C. mellificaе* и  
11 овај пар прајмера произвео је PCR продукт од 247 бп. Прајмери за *C. mellificaе*  
12 (CmCitb\_F + CmCitb\_R) окружују регион ДНК који садржи 13 полиморфних места  
13 јединствених за *C. mellificaе* у поређењу са *L. passim* и овај пар прајмера произвео је  
14 PCR продукт од 140 бп. Ниједан од ових парова прајмера није унакрсно реаговао са  
15 ДНК пчелињих трипанозома добијених из чистих ћелијских линијских култура, нити су  
16 унакрсно реаговали са сродном врстом која инфицира бумбаре, *C. bombi*. Анализе  
17 серијских разблажења мешавине ДНК врста *L. passim* и *C. mellificaе* потврдиле су да је  
18 сваки прајмер био *species*-специфичан. Специфичност прајмера за наведене врсте  
19 потврђена је и при анализи различитих односа разблажења, односно у случајевима  
20 када је у мешавини ДНК две врсте, преовладавала ДНК из једне или друге врсте. При  
21 анализи различитих нивоа разблажења мешавине ДНК врста *L. passim* и *C. mellificaе*  
22 ( $10^{-1}$  наспрам  $10^{-4}$ ) није дошло до неспецифичне PCR амплификације. Анализом 162  
23 архивска узорка ДНК пчела (сакупљених са 57 локалитета на територији Србије у  
24 периоду 2007-2015) детектована је само једна трипанозомална врста *L. passim* и то у  
25 101 узорку са 44 локалитета. Резултати су показали да је *L. passim* била присутна у  
26 узорцима из сваке године у периоду 2007-2015 при чему се годишња заступљеност  
27 кретала у опсегу од 38.9% до 83.3% и то: 72.2% у 2007. год., 38.9% у 2008. год., 72.2% у  
28 2009. год., 61.1% у 2010. год., 83.3% у 2011. год., 83.3% у 2012. год., 38.9% у 2013. год.,  
29 66.7% у 2014. год. и 44.4% у 2015. год. Ови резултати показују да је *L. passim* била  
30 конзистентно присутна код пчела у Србији у периоду од 2007. до 2015. године са  
31 умереном до високом годишњом заступљеношћу (38.9–83.3%), а просечном 62.3% за  
32 наведени 9-годишњи период. Друга врста, *C. mellificaе*, није нађена ни у једном узорку.  
33 Ови подаци представљају резултат најдужег молекуларног скрининга узорака на  
34 присуство пчелињих трипанозома. Детекцијом *L. passim* у узорцима из 2007. године  
35 обезбеђен је најстарији генетички потврђени налаз *L. passim* на глобалном нивоу, као и  
36 први налаз *L. passim* у Србији. Од микроспоридија је само *N. ceranae* била детектована,  
37 док *N. apis*, као ни мешовите инфекције са *N. apis* / *N. ceranae* није било. Преваленција  
38 *N. ceranae* је била јако висока, јер је ова врста пронађена у 155 узорака (95,7%) и није  
39 постојала ни једна локација у Србији у којој бар једна кошница није инфицирана са *N.*  
40 *ceranae*. Већина друштава (60,5%,  $n = 98$ ) била је ко-инфицирана са *L. passim* и *N.*  
41 *ceranae*, а оне су биле пореклом са 43 локалитета широм Србије, укључујући и Београд.  
42 У 35,2% друштава ( $n = 57$ ) са 32 локације детектована је само *N. ceranae*, а само 1,9%  
43 ( $n=3$ ) друштава је било инфицирано само са *L. passim*. Анализа узорака из  
44 деветогодишњег периода (2007-2015) показала је да између заступљености инфекција  
45 са *L. passim* и *N. ceranae* није постојала статистички значајна разлика (*Fisher exact* тест,  
46  $p=0,427$ ).

47 У другом поглављу приказани су резултати који потврђују да је успостављена  
48 *real-time* PCR метода за утврђивање степена инфестације пчела трипанозомама.  
49 Новодизајнирани *forward* прајмер LpCytb\_F2 и *reverse* прајмер LpCytb\_R у  
50 оптимизованој *real-time* PCR реакцији обезбедили су успешну симултану детекцију и  
51 квантификацију *L. passim*. Коришћењем те методе, анализом узорака одраслих пчела  
52 (путем *real-time* PCR метода) из групе са *L. passim*-позитивним друштвима, утврђено је  
53 да је највећи степен инфекције оба паразита (*N. ceranae* и *L. passim*) достигнут током  
54 зимских месеци, док је најнижи ниво инфекције са оба патогена забележен у јулу  
55 (месецу са највишом просечном месечном температуром). У узорцима из *L. passim*-  
56 негативних друштава ниво инфекције са *N. ceranae* био је сличан као и код *L. passim*-  
57 позитивних друштава (највећи у зимским месецима, а најнижи у јулу). И код једне и код  
58 друге групе константно је била присутна инфекција са *N. ceranae*. Пошто није  
59 установљена статистички значајна разлика ( $p>0,05$ ) у броју спора на месечном нивоу,  
60 као ни у целокупно испитиваном периоду ( $p>0,05$ ), целокупан ефекат разлике између

1 ове две групе приписан је утицају *L. passim*. Путем новоуспостављене *real-time* PCR  
2 методе утврђено је и да у пчелињим друштвима која су природно инфицирана  
3 ендопаразитима *N. ceranae* и *L. passim* постоји позитивна корелација (Spearman | r  
4 |=0,66, p<0,0001) између њихових степена инфекција током године, односно њихова  
5 слична сезоналност. Посматрајући корелациони однос између температуре и ова два  
6 патогена код *L. passim*-позитивних друштава, установљена је негативна корелациона  
7 зависност за *N. ceranae* (Spearman | r |=-0,76, p<0,0001) и *L. passim* (Spearman | r |= -  
8 0,64, p<0,0001). Код *L. passim*-негативних друштава установљена је негативна  
9 корелација између температуре и *N. ceranae* (Spearman | r |=-0,75, p<0,0001) током  
10 испитујућег периода.

11 У трећем поглављу наведени су резултати који говоре о утицају присутних  
12 трипанозома на јачину и здравствено стање пчелињих заједница и економске ефекте у  
13 пчеларској производњи. Резултати који говоре о утицају *L. passim* на јачину пчелињег  
14 друштва добијени су применом t-теста за независне узорке *L. passim*-негативна  
15 друштва су имала значајно већу површину отвореног легла (cm<sup>2</sup>) у марту (t=2,17 df=18,  
16 p<0,05) и у јуну (t=2,13 df=18, p<0,05) у односу на *L. passim*-позитивна друштва, док у  
17 септембру није установљена значајна разлика (t=1,422 df=18, p>0,05) између ове две  
18 групе. *L. passim*-негативна друштва су имала су значајно већу површину затвореног  
19 легла (cm<sup>2</sup>) у марту (t=2,74 df=18, p<0,05) и јуну (t=2,60 df=18, p<0,05) у односу на *L.*  
20 *passim*-позитивна друштва, док у септембру није установљена значајна разлика (t=0,08  
21 df=18, p>0,05). Резултати за број одраслих пчела у кошници указују да су *L. passim*-  
22 негативна друштва имала значајно већи број одраслих пчела у марту (t=3,15 df=18,  
23 p<0,01), као и у јуну (t=2,84 df=18, p<0,05), док у септембру није установљења значајна  
24 разлика (t=2,05 df=18, p>0,05). *L. passim*-негативна друштва су имала значајно већу  
25 површину саћа са медом (cm<sup>2</sup>) у јуну (t=2,33 df=18, p<0,05), док у марту (t=0,06 df=18,  
26 p>0,05) и септембру (t=1,88 df=18, p>0,05) није установљена значајна разлика.  
27 Површина саћа са пергом (cm<sup>2</sup>) између *L. passim*-позитивних друштава и *L. passim*-  
28 негативних друштава се није значајно разликовала ни у марту (t=1,228 df=18, p>0,05),  
29 ни у јуну (t=1,79 df=18, p>0,05), ни у септембру (t=0,1809 df=18, p>0,05). Принос меда  
30 (kg) код *L. passim*-негативних друштава био је значајно већи (t=2,133 df=18, p<0,05) у  
31 односу на принос код *L. passim*-позитивних друштава.

32 Активност SOD је била значајно већа код *L. passim*-позитивних друштава и у  
33 јуну и у септембру у односу на *L. passim*-негативна друштва (Mann-Whitney U-test;  
34 p<0,05). *L. passim*-позитивна друштва су имала значајно већу активност у јуну у односу  
35 на септембар (t-тест за зависне узорке; t=2,56; df=9; p<0,05). Активност CAT у јунском  
36 узорковању је била значајно већа код *L. passim*-позитивних друштава у односу на *L.*  
37 *passim*-негативна друштва (t-тест за независне узорке; t=3,01; df=18; p<0,01). *L. passim*-  
38 позитивна друштва су имала значајно већу активност у јуну, у односу на септембар (t-  
39 тест за зависне узорке; t=3,20; df=9; p<0,05). Активност GST у јуну код *L. passim*-  
40 позитивних друштава била је значајно већа у односу на исто узорковање код *L. passim*-  
41 позитивних друштава (t-тест за независне узорке; t=2,69; df=18; p<0,05). Концентрација  
42 MDA је код *L. passim*-позитивне групе у септембру била значајно већа у односу на *L.*  
43 *passim*-негативна друштва (Mann-Whitney U test; p<0,001). У јунском узорковању, *L.*  
44 *passim*-позитивна друштва су имала значајно већу концентрацију MDA у односу на *L.*  
45 *passim*-негативна друштва (Mann-Whitney U test; p<0,05).

46 У поглављу **Дискусија**, кандидат је критички размотрио и тумачио добијене  
47 резултате. Обзиром да је главни предмет истраживања *L. passim* која је недавно  
48 описана и да је било доступно само неколико радова са подацима о тој врсти, кандидат  
49 је само за део резултата могао да обави поређење са резултатима других аутора. Већи  
50 део резултата ове дисертације су први подаци добијени методама које су такође први  
51 пут у овој дисертацији успостављене. Међутим, кандидат је успео да све резултате у  
52 дискусији повеже са литературним подацима, наглашавајући уочене ефекте *L. passim*  
53 на кондиционо стање пчела и њихову продуктивност, односно економске показатеље у  
54 пчеларству.

55 У поглављу **Литература** дат је списак свих 170 референци које су цитиране у  
56 докторској дисертацији.

57  
58  
59

1 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**  
2 **дисертацији):**  
3

- 4 • Дизајнирани су и валидирани први прајмери и конвенционална PCR метода за  
5 идентификацију врста *L. passim* и *C. mellificaе* чиме је омогућено рутинско  
6 испитивања преваленције, као и епизоотиолошко истраживање ових паразита пчела.  
7
- 8 • Ретроспективна анализа узорака из деветогодишњег периода (2007-2015) обављена  
9 у овом раду представља прво дугорочно испитивање присуства обе врсте пчелињих  
10 трипанозома у свету.  
11
- 12 • Код пчела у Србији пореклом из периода 2007-2015 утврђено је присуство само  
13 једне врсте пчелињих трипанозома, *L. passim*, чија је годишња заступљеност била у  
14 опсегу 38.9–83.3%, а просечна заступљеност за наведени 9-годишњи период 62.3%.  
15
- 16 • Детекцијом *L. passim* у анализираним узорцима пчела обезбеђен је први налаз ове  
17 врсте у Србији, а откриће *L. passim* у узорцима из 2007. године представља  
18 најстарији генетички потврђен налаз овог паразита на глобалном нивоу.  
19
- 20 • Већина пчелињих друштава (60.5%) анализираних у периоду 2007-2015 била је ко-  
21 инфицирана са *L. passim* и *N. ceranae*, док је заступљеност друштава инфицираних  
22 са *L. passim* била само 1,9%, на основу чега се може закључити да ове две врсте  
23 имају различите микроеколошке нише, тако да несметано паразитирају у истом  
24 домаћину.  
25
- 26 • Дизајнирани су прајмери за *real-time* PCR и обављена оптимизација те методе која  
27 обезбеђује истовремену детекцију и квантификацију *L. passim*, а самим тим и  
28 детаљно праћење *L. passim* инфекције на терену.  
29
- 30 • Значајна позитивна корелација ( $p < 0,0001$ ) између нивоа инфекције *L. passim* и *N.*  
31 *ceranae* указује на сличну годишњу динамику инфекције ова два паразита.  
32
- 33 • Значајне разлике ( $p < 0,05$ ) у нивоима инфекције *L. passim* и *N. ceranae* између  
34 месеци указују на сезонски карактер у учесталости оба паразита.  
35
- 36 • Највеће оптерећење пчела са *N. ceranae* и *L. passim* је забележено у зимским  
37 месецима, а најмање током лета, односно у јулу при највишим температурама.  
38
- 39 • Смањење активност супероксид дисмутазе (SOD) уз истовремено повећање  
40 активности каталазе (CAT) и глутатион С-трансферазе (GST), као и концентрације  
41 малондиалдехида (MDA) током активне сезоне, указује да инфекција са *L. passim*  
42 изазива оксидативни стрес, што може негативно утицати на кондицију и  
43 продуктивност пчела а самим тим и на економске ефекте у пчеларству.  
44
- 45 • Економска евалуација израђених модела за смањење броја инфекта у пчелињим  
46 друштвима, показала је да постоји позитиван економски ефекат код оба модела.  
47 Позитивна нето садашња вредност (НСВ) модела А је 4.501.835,77 динара, а модела  
48 Б је 4.785.779,61 динара. Параметар који показује однос добити и трошкова је већи  
49 од један ( $ОДТ \geq 1,00$ ) и износи код модела А=2,17, а код модела Б=2,23. На основу  
50 вредности интерне стопе повећања (ИСП) установљено је да би оба програма за  
51 смањење броја инфекта у пчелињим друштвима били економски оправдани.  
52

53  
54 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**  
55 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**  
56 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**  
57 **резултата):**  
58

59 Резултати истраживања, које је у оквиру израде докторске дисертације спровео  
60 кандидат, у потпуности су у складу са постављеним циљем и задацима истраживања.

1 Добијени резултати приказани су прецизно, логичним редоследом, прегледно, јасним и  
2 разумљивим стилем. Тумачење добијених резултата указује на зрелост кандидата, што  
3 је обезбедило правилно извођење закључака који произилазе из добијених резултата и  
4 обезбеђују њихову примену у пракси ветеринара и пчелара.

## 7 VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

### 9 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави 10 теме?

11 Да. Докторска дисертација кандидата Бранислава Вејновића под насловом  
12 „Молекуларно-генетичка идентификација трипанозоме *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 и  
13 анализа њених ефеката на здравље пчелињих заједница и економске ефекте у  
14 пчеларству“ је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

### 17 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску 18 дисертацију?

19 Докторска дисертација кандидата Бранислава Вејновића под насловом  
20 „Молекуларно-генетичка идентификација трипанозоме *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 и  
21 анализа њених ефеката на здравље пчелињих заједница и економске ефекте у  
22 пчеларству“ садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију.

### 25 3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

26 Дисертација под називом „Молекуларно-генетичка идентификација трипанозоме  
27 *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 и анализа њених ефеката на здравље пчелињих  
28 заједница и економске ефекте у пчеларству“, кандидата Бранислава Вејновића  
29 представља оригиналан допринос науци јер је обезбедила нове прајмере специфичне  
30 за врсте трипанозома *Crithidia mellificae* и *Lotmaria passim* и нову PCR методу за  
31 њихову прецизну и брзу идентификацију без потребе за секвенционирањем.  
32 Применом тих прајмера и те методе је обављен први дугорочни молекуларни скрининг  
33 пчела из Србије и добијен најстарији генетички потврђени налаз *L. passim* на свету и  
34 први налаз ове врсте у Србији. Затим, први пут је успостављена метода qPCR за  
35 истовремену детекцију и квантификацију *L. passim* у узорку, која је подразумевала  
36 дизајн још једног пара специфичних прајмера адекватних за *real-time* PCR. Захваљујући  
37 томе, први пут је откривено да у пчелињим друштвима која су природно инфицирана  
38 ендопаразитима *Nosema ceranae* и *L. passim* постоји значајна позитивна корелација  
39 између њихових степена инфекција током године, односно њихова слична сезоналност,  
40 као и негативна корелација са амбијенталном температуром. Први пут је доказано да *L.*  
41 *passim* изазива оксидативни стрес и негативно утиче на кондицију и продуктивност  
42 пчела, а самим тим има негативне економске ефекте на пчеларство. У овом  
43 истраживању први пут је примењена економска евалуација модела за смањење броја  
44 инфеката у пчелињим друштвима методом анализе добити и трошкова и показала је  
45 позитиван ефекат код оба постављена модела.



1 IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ  
2 ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА  
3 НАЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања,  
4 наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику  
5 о поступку, начину вредновања, и квантитативном исказивању  
6 научноистраживачких резултата истраживача):  
7

- 8 • Vejnovic Branislav, Stevanovic Jevrosima, Schwarz Ryan S, Aleksic Nevenka, Mirilovic  
9 Milorad, Jovanovic Nemanja M, Stanimirovic Zoran (2018) Quantitative PCR assessment  
10 of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*,  
11 *Journal of Invertebrate Pathology* 151, 76-81, DOI: 10.1016/j.jip.2017.11.003

12 Импакт фактор часописа: **2.511**, категорија: **M21**

- 13 • Stevanovic Jevrosima, Schwarz Ryan S, Vejnovic Branislav, Evans Jay D, Irwin  
14 Rebecca E, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2016) Species-specific diagnostics of  
15 *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and  
16 microsporidians in Serbian honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology* 139, 6-11,  
17 DOI: 10.1016/j.jip.2016.07.001

18 Импакт фактор часописа: **2.511**, категорија: **M21**

19  
20 **X ПРЕДЛОГ:**

21  
22 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:**

23  
24 **- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана**

25  
26  
27 ДАТУМ

28 28. 09. 2018.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

29  
30  
31 \_\_\_\_\_  
32 Др Јевросима Стевановић, ванредни професор  
33 Факултет ветеринарске медицине  
34 Универзитет у Београду

35  
36  
37 \_\_\_\_\_  
38 Др Милорад Мириловић, ванредни професор,  
39 Факултет ветеринарске медицине,  
40 Универзитет у Београд

41  
42  
43 \_\_\_\_\_  
44 Др Зоран Станимировић, редовни професор  
45 Факултет ветеринарске медицине  
46 Универзитет у Београду

47  
48  
49 \_\_\_\_\_  
50 Др Невенка Алексић, редовни професор  
51 Факултет ветеринарске медицине  
52 Универзитета у Београду

53  
54  
55 \_\_\_\_\_  
56 Др Драган Ђирковић, доцент,  
57 Департман за хемијско технолошке науке,  
58 Државни Универзитет у Новом Пазару