

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10 Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 189.
11 sednici održanoj 17.10.2018. godine.

12
13 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
14 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
15 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

16 **Napomena:** redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih
17 institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upisuje
18 pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.

19
20 1. dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor, Patologija, 2005. godina, Fakultet
21 veterinarske medicine u Beogradu (mentor 1)

22
23 2. dr Vladimir Polaček, viši naučni saradnik, Biotehničke nauke, veterinarstvo, predklinička
24 veterina, patologija, 2017. godina, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“ (mentor 2)

25
26 3. dr Ivana Vucicevic, docent, Patologija, 2017. godina, Fakultet veterinarske medicine u
27 Beogradu

28
29 4. dr Miloš Vučićević, docent, Klinička patologija i terapija životinja, 2017. godina, Fakultet
30 veterinarske medicine u Beogradu

31
32 5. dr Tamaš Petrović, naučni savetnik, Biotehničke nauke, veterinarstvo, mikrobiologija i
33 zarazne bolesti, 2016. godina, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“.

34
35 II PODACI O KANDIDATU:

36
37 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

38 Biljana, Vidoje, Božić

39 2. Datum rođenja, opština, Republika:

40 02.10.1987. Novi Sad, R.Srbija

41
42 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

43
44 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

45
46 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

47 UPOREDNA ANALIZA MORFOLOŠKIH PROMENA I DISTRIBUCIJE VIRUSNOG
48 ANTIGENA U ORGANIMA LABUDOVA I KOKOŠAKA PRIRODNO INFICIRANIH VIRUSOM
49 AVIJARNE INFLUENCE PODTIPA H5N8

50
51 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana poglavlja, slika, šema,
52 grafikona i sl.):

53 Doktorska disertacija je napisana na 138 strana, podeljena u osam poglavlja: Uvod (3 strane),
54 Pregled literature (42 strane), Cilj i zadaci (1 strana), Materijal i metode (13 strana), Rezultati
55 (42 strane), Diskusija (13 strana), Zaključci (2 strane) i Spisak literature (218 referenci). Tekst
56 disertacije prati 55 slika i 21 tabelarni prikaz podataka.

57
58 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
59 svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i
60 zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –

1 nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u
2 doktorskoj disertaciji):
3

4 U **Uvodu** kandidatkinja iznosi značaj izučavanja virusa avijarne influence navodeći podatak
5 da je prvi slučaj avijarne influence podtipa H5N8 u našoj zemlji zabeležen kod labudova
6 grbaca (*Cygnus olor*) sa lokaliteta specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-Petrovaradinski rit“,
7 krajem 2016. godine. Tokom ove epizootije, labudovi su se pokazali kao veoma osetljiva vrsta
8 divljih ptica, sa visokim stepenom mortaliteta i pojavom nervnih simptoma bolesti. Pored
9 labudova, virus je dijagnostikovao i kod kokošaka na dva različita lokaliteta, u
10 Srednjobanatskom i Južnobačkom okrugu. Kao prvi slučaj avijarne influence u Srbiji od
11 epizootije virusa avijarne influence podtipa H5N1 iz 2006. godine, prirodna infekcija virusom
12 podtipa H5N8, predstavlja interesantan predmet morfoloških ispitivanja. Izrazita genetička
13 varijabilnost i nestabilnost genoma virusa omogućavaju nastanak velikog broja različitih
14 podtipova virusa avijarne influence sa izmenjenim svojstvima u pogledu antigenskih osobina,
15 patogenosti i specifičnosti prema domaćinu. Mnogi podaci su i dalje nepoznati u vezi sa
16 morfološkim manifestacijama bolesti kod različitih vrsta ptica.
17

18 U poglavlju **Pregled literature**, sistematski se navode publikovani podaci koji se odnose na
19 istorijat, taksonomiju i morfologiju virusa avijarne influence, zatim na otpornost virusa na
20 fizičke i hemijske agense. Obuhvaćeni su podaci iz literature koji se odnose na replikaciju
21 virusa, patogenezu, kliničku sliku bolesti i patomorfološke promene, sa posebnim osvrtom na
22 makroskopske promene, patohistološki nalaz i imunski odgovor. Takođe se kandidatkinja
23 posebno fokusira u poglavlju Pregled literature na podatke koji se odnose na dijagnostiku i
24 kontrolu bolesti, kao i na do sada poznate razlike u manifestacijama avijarne influence kod
25 domaće živine i divljih ptica. Konačno navodi podatke koji se odnose na epizootologiju virusa
26 avijarne influence H5N8 na globalnom nivou i posebno u Srbiji.
27

28 **Cilj i zadaci** ove disertacije odnose se na uporedno ispitivanje i poređenje morfoloških
29 karakteristika avijarne influence podtipa H5N8 u uslovima prirodne infekcije kod labudova i
30 kokošaka, radi dobijanja uvida u tropizam virusa u tkivima dve različite vrste ptica, kao i
31 izučavanja uloge pojedinih ćelija inflamacije u patogenezi bolesti. Pored toga, cilj istraživanja
32 je bio i identifikacija i molekularna karakterizacija virusa influence kao i utvrđivanje mesta
33 izolovanog virusa na filogenetskom stablu, odnosno njegove pripadnosti određenom
34 genotipu. Navedeni ciljevi su ostvareni kroz sledeće zadatke:

- 35 - Molekularno-genetička ispitivanja - dokazivanje prisustva virusa avijarne influence
36 podtipa H5N8 primenom real time RT- PCR metode kod labudova i kokošaka uginulih tokom
37 epizootije u Srbiji 2016-2017. godine;
- 38 - Filogenetska analiza identifikovanog virusa avijarne influence;
- 39 - Opis makroskopskih promena na različitim organima (mozak, pluća, srce, pankreas,
40 bubreg, creva, slezina) labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence
41 podtipa H5N8;
- 42 - Opis mikroskopskih promena na organima (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg,
43 creva, slezina) labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa
44 H5N8;
- 45 - Ispitivanje distribucije i ekspresije antigena virusa avijarne influence podtipa H5N8 u
46 različitim organima (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg, creva, slezina) inficiranih labudova
47 i kokošaka;
- 48 - Imunohistohemijsko utvrđivanje imunofenotipa i distribucije ćelija inflamacije (CD3,
49 CD21) u tkivima - organima labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne
50 influence H5N8;
- 51 - Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije glijalnog kiselog fibrilanog proteina (GFAP)
52 u uzorcima mozga inficiranih ptica;
- 53 - Statističko određivanje zavisnosti distribucije virusnog antigena i intenziteta
54 patomorfoloških promena kod prirodno inficiranih labudova i kokošaka.
55

56 **Materijal i metode:** Kao materijal za izradu ove doktorske disertacije korišćena su tkiva
57 (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg, creva, slezina) petnaest odraslih uginulih labudova i
58 petnaest kokošaka uginulih tokom epizootije avijarne influence podtipa H5N8, tokom zime
59 2016-2017. godine. U skladu sa postavljenim ciljem i zadacima, u toku ispitivanja materijala,
60 primenjene su različite molekularne i morfološke metode: metoda reverzne transkripcije -

lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real time RT- PCR), metoda sekvenciranja izolata virusa avijarne influence, izrada filogenetskog stabla, makroskopska, histopatološka (HE) i imunohistohemijska ispitivanja korišćenjem različitih antitela (anti-nukleoprotein virusa influence, anti GFAP, anti CD3, anti CD21, uz odgovarajuća sekundarna antitela i hromogene za vizuelizaciju reakcije).

Rezultati ispitivanja sa filogenetskim analizama potvrđuju da virus dokazan real time RT-PCR metodom pripada kladi 2.3.4.4 i grupi b, ukazujući na srodnost virusa sa izolatima iz Mađarske, Hrvatske i Makedonije. Morfološkim ispitivanjima utvrđene su makroskopski dominantne promene u vidu nekroze, krvavljenja i kongestije većine organa, na ispitivanim tkivima obe vrste ptica. U poređnim makroskopskim ispitivanjem odabranih organa, razlika u zastupljenosti patoanatomskih promenama zapažena je u pankreasu i bubrezima obe vrste ptica i dodatno je definisana histološkim i imunohistohemijskim analizama. Patohistološke promene kod obe vrste ptica najčešće su bile zastupljene u mozgu, pankreasu, slezini, srcu i plućima, u vidu hiperemije, nekroze i krvavljenja. Mikroskopskim pregledom je potvrđeno da se krvavljenja u pankreasu nalaze samo kod labudova, a izostaju kod kokošaka. Statističkom analizom ovih promena u pankreasu između labudova i kokošaka je utvrđena statistički značajna razlika $p < 0,001$. Virusni antigen je dokazan u organima u kojima nisu utvrđene makroskopski vidljive promene – u bubrezima kod labudova, i u pankreasu kod kokošaka. Kod obe vrste ptica, intenzivna ekspresija virusnog antigena dokazana je u mozgu i pankreasu. Utvrđeno je da virus A1 podtipa H5N8 pokazuje tropizam prema makrofagima, epitelnim ćelijama, endotelnim ćelijama i nervnom tkivu. Kod labudova nije uočeno prisustvo virusnog antigena u crevnom epitelu. Pojava nervnih simptoma, negnojnog encefalitisa, ekspresije virusnog antigena u neuronima, kao i velike količine GFAP+ astrocita kod obe vrste ptica ukazuje na neurotropno svojstvo virusa. Imunohistohemijskom analizom je utvrđeno da dominantnu ćelijsku populaciju u mononuklearnom inflamatornom infiltratu čine CD3+ T limfociti.

U poglavlju **Diskusija**, dr vet. med. Biljana Božić analizira i poredi rezultate svojih ispitivanja sa navodima iz dobro odabrane literature i na kraju iznosi da do danas u literaturi ne postoje podaci o fenotipizaciji ćelija inflamacije u toku H5N8 infekcije. U cilju dalje analize patogeneze i imunskog odgovora kod avijarne influence labudova i kokošaka, dodatna istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na primenu različitih B-ćelijskih markera kao i CD4 i CD8 antitela u cilju diferencijacije T ćelija. S obzirom da se mnogi parametri ne mogu kontrolisati u uslovima prirodne infekcije, prednost eksperimentalnih istraživanja bi se ogledala i u mogućnosti praćenja nastanka inflamatorne reakcije i uloge pojedinih ćelija u inflamaciji.

U spisku referenci kandidatkinja pravilno navodi i u tekstu citira, 218 dobro odabranih referenci.

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

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Virus avijarne influence podtipa H5N8 dokazan je u svim ispitivanim uzorcima poreklom od labudova i kokošaka metodama real-time RT-PCR i imunohistohemijski.
2. Filogenetskim analizama dokazano je da izolovani virus pripada kladi 2.3.4.4 i grupi b, kao i srodnost virusa sa izolatima iz Mađarske, Hrvatske i Makedonije.
3. Dominantne makroskopske promene uočene na tkivima obe vrste ptica su: nekroze i krvavljenja u većini organa. Statistički značajna razlika u makroskopskim promenama kod labudova i kokošaka utvrđena je u pankreasu, u vidu krvavljenja i nekroza ($p < 0,001$), dok je u bubrezima utvrđena razlika u pojavi krvavljenja ($p < 0,05$). U ostalim organima obe vrste ptica nisu utvrđene značajne razlike u ispoljavanju makroskopskih promena.
4. Patohistološke promene kod obe vrste ptica najčešće su bile zastupljene u mozgu, pankreasu, slezini, srcu i plućima, u vidu hiperemije, nekroze i krvavljenja. Mikroskopskim pregledom je potvrđeno da se krvavljenja u pankreasu nalaze samo kod labudova, a izostaju

1 kod kokošaka. Statističkom analizom patohistoloških promena u pankreasu labudova i
2 kokošaka utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$).

3
4 5. Imunohistohemijskom metodom virusni antigen je dokazan u organima u kojima nisu
5 utvrđene makroskopski vidljive promene – u bubrezima labudova, i pankreasu kokošaka.

6
7 6. Kod obe vrste ptica, intenzivna ekspresija virusnog antigena dokazana je u mozgu i
8 pankreasu. Utvrđeno je da virus AI podtipa H5N8 pokazuje tropizam prema makrofagima,
9 epitelnim ćelijama, endotelnim ćelijama i nervnom tkivu.

10
11 7. Razlike u zastupljenosti i ekspresiji virusnog antigena utvrđene su u srcu ($p < 0,001$),
12 plućima ($p < 0,001$), i crevima ($p < 0,05$), sa intenzivnijom ekspresijom virusnog antigena kod
13 kokošaka u odnosu na labudove.

14
15 8. Kod labudova nije uočeno prisustvo virusnog antigena u crevnom epitelu, što bi
16 moglo da ukaže na primarnu ekskreciju virusa kod ove vrste ptica orofaringealnim putem.

17
18 9. Pojava nervnih simptoma bolesti, negnojnog encefalitisa, ekspresije virusnog antigena u
19 neuronima i brojnih GFAP+ astrocita, kod obe vrste ptica, ukazuje na neurotropno svojstvo
20 virusa.

21
22 10. Imunohistohemijskom analizom je utvrđeno da dominantnu ćelijsku populaciju u
23 mononuklearnom inflamatornom infiltratu čine CD3+ T limfociti.

24
25 11. Veliki procenat mortaliteta i morbiditeta prirodno inficiranih labudova ukazuje na
26 visoku osetljivost ove vrste na HPAI H5N8 infekciju. Hipotezu da ova vrsta ptica nema status
27 dugoročnog nosioca virusa AI podtipa H5N8, treba potvrditi daljim istraživanjima.

28
29
30 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
31 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
32 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

33
34
35 Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru doktorske disertacije kandidatkinje **Biljane Božić**
36 su u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, a zaključci su pravilno izvedeni i
37 proizilaze iz dobijenih rezultata.

38
39
40 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

41
42 1. **Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi**
43 **teme?**

44 2.
45 **DA**

46
47 2. **Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

48
49 **DA**

50
51 3. **Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

52
53 Rezultati uporedne analize morfoloških promena i distribucije virusnog antigena u
54 organima labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa
55 H5N8, proizvod su prvog ispitivanja ove vrste sprovedenog na prirodno inficiranim
56 pticama kod nas, a razlike ustanovljene pri makroskopskom i mikroskopskom pregledu
57 kao i distribucija antigena značajne su za razumevanje patogeneze i transmisije virusa u
58 populacijama divljih i domaćih ptica. Posebno je značajno to što je filogenetskim
59 analizama utvrđeno da izolovani virus pripada kladi 2.3.4.4 i grupi b i upućuju na srodnost
60 virusa dokazanog u Srbiji, sa izolatima iz Mađarske, Hrvatske i Makedonije.

1
2 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
3 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sad da ili ne):**
4 **Ne**

5
6 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
7 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
8 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
9 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
10 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**
11

- 12 • **Božić Biljana**, Polaček Vladimir, Vučićević Ivana, Vidanović Dejan, Vasković Nikola,
13 Prodanov-Radulović Jasna, Aleksić-Kovačević Sanja (2018): MORPHOLOGICAL
14 DIFFERENCES OF PANCREATIC LESIONS IN MUTE SWANS AND HENS
15 NATURALLY INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS
16 H5N8, Acta Veterinaria-Beograd, 68, (2), 217-223, doi : 10.2478/acve-2018-0018,
17 Impakt faktor časopisa: 0.604, kategorija: **M23**
- 18
19 • **Božić Biljana**, Vučićević Ivana, Polaček Vladimir, Vasković Nikola, Petrović Tamaš,
20 Pajić Marko, Kovačević-Aleksić Sanja: COMPARATIVE MORPHOLOGIC FINDINGS
21 IN MUTE SWANS NATURALLY INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC AVIAN
22 INFLUENZA VIRUSES H5N1 AND H5N8 DETECTED IN SERBIA, Veterinaria
23 Italiana (in press), 2018, Impakt faktor časopisa: 0.916, kategorija: **M22**
- 24
25 • **Božić Biljana**, Pajić Marko, Petrović Tamaš, Pelić Miloš, Samojlović Milena, Polaček
26 Vladimir: PATHOLOGIC CHANGES IN SWANS INFECTED WITH HIGHLY
27 PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (H5N8) VIRUS (2017): Archives of Veterinary
28 Medicine, ISSN 1820-9955, 9, 2, 77-86, UDK 619:616:921.5:598.414, kategorija: **M51**
29
30
31

32 **X PREDLOG:**

33
34 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
35 **ponuđenih mogućnosti):**
36

37 **Da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
38
39

40 DATUM
41 25.10.2018.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

42
43
44
45
46 _____
47 1. dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor

48
49 _____
50 2. dr Vladimir Polaček, naučni saradnik

51
52 _____
53 3. dr Ivana Vučićević, docent

54
55 _____
56 4. dr Miloš Vučićević, docent
57 _____

