

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 18.03.2015.; Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
11 (154. sednica)

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

- 15 • Dr Zoran Stanimirović – redovni profesor, mentor 1, Biologija – genetika, 2007,  
16 Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.
- 17 • Dr Dejan Vidanović - naučni saradnik, mentor 2, Mikrobiologija sa imunologijom,  
18 2012, Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“.
- 19 • Dr Sonja Radojičić – redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i  
20 bolesti pčela i sviloprelja, 2011, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u  
21 Beogradu.
- 22 • Dr Jevrosima Stevanović – vanredni profesor, Biologija, 2015 Fakultet veterinarske  
23 medicine, Univerziteta u Beogradu.
- 24 • Dr Jakov Nišavić – vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014 Fakultet  
25 veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

26  
27 II PODACI O KANDIDATU:

28  
29 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Predrag, Radan Simeunović

30  
31 2. Datum rođenja, opština, Republika: 17.04.1984., Šabac, Šabac, SFRJ

32  
33 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*:

34  
35 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:

36  
37 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

38 „Molekularno-genetička detekcija i identifikacija uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija  
39 zastupljenih kod pčelinjih društava na teritoriji Srbije“.

40 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,  
41 grafikona i sl.):

42 Doktorska disertacija dipl. vet. Predraga Simeunovića je napisana na 163 strane štampanog  
43 teksta sa 56 tabela, 12 grafikona, 6 slika i sadrži sledeća poglavlja: 1. Uvod (strana 1 - 3); 2.  
44 Pregled literature (strana 3 - 44); 3. Cilj istraživanja (strana 44 – 45); 4. Materijal i metode  
45 (strana 45 – 60); 5. Rezultati istraživanja (strana 60 – 116); 6. Diskusija (strana 116 – 142); 7.  
46 Zaključak (142 – 143); 8. Zahvalnica (143 - 144); 9. Spisak literature (strana 144 – 166).

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

50 U uvodnom delu doktorske disertacije, dipl. vet. Predrag Simeunović navodi ekološki i  
51 ekonomski značaj medonosne pčele, *Apis mellifera*, kao jednog od najkorisnijih insekata na  
52 planeti. Opisana je ekološka uloga medonosne pčele kao jednog od najznačajnijih oprašivača  
53 ne samo gajenih biljaka, već i velikog broja biljaka divlje flore. Sa ekonomske tačke gledišta,  
54 pčela je značajna kao oprašivač useva i gajenih biljaka, s jedne, odnosno kao proizvođač  
55 meda i drugih pčelinjih proizvoda, s druge strane. Od najznačajnijih patogenih uzročnika koji  
56 mogu izazvati ozbiljne posledice po pčelinju zajednicu, posebna pažnja se poklanja delovanju

1 parazitskih infekcija (pčelinji krpelj *V. destructor* i endoparaziti roda *Nosema*) i virusnih  
2 infekcija u pojavi kolapsa pčelinjih zajednica (eng. Colony Collapse Disorder, CCD). Pomenut  
3 je patogeni potencijal različitih virusa i njihova povezanost sa uginućima pojedinačnih pčela i  
4 pčelinjih društava, kao i raširenost mikrosporidije *Nosema ceranae* i njena često dominantna  
5 uloga u gubicima pčelinjih društava širom sveta. Na osnovu podataka o vrednosti useva koje  
6 pčele oprašuju u Evropi i ostatku sveta, razmljiv je i značaj ovakve vrste ispitivanja prisustva i  
7 zastupljenosti mikrosporidija i virusa kao najznačajnijih činioca u nastajanju masovnih  
8 gubitaka pčelinjih društava.

9 U poglavlju „**Pregled literature**“, pozivajući se na reference domaćih i stranih istraživača,  
10 izneti su podaci koji se odnose na osobine mikrosporidija i virusa kao uzročnika infekcija  
11 pčelinjih društava. U podpoglavljju koje se odnosi na mikrosporidije pčela, opisane su  
12 morfološke i genetske karakteristike dve vrste mikrosporidija koje parazitiraju u evropskoj  
13 medonosnoj pčeli, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Uz to, prikazana je rasprostranjenost,  
14 klinička slika infekcije i patogeni potencijal koji uzročnici ostvaruju na nivou pčelinje zajednice.  
15 Istraživanja novijeg datuma pokazuju gotovo potpuno odsustvo *N. apis* na teritoriji Srbije i  
16 okolnih zemalja, sa potpunom dominacijom *N. ceranae*. Opisane su promene koje nastaju  
17 kao posledica mikrosporidijalnih infekcija na nivou pojedinačnih pčela, kao i na nivou  
18 pčelinjeg društva. Kao posledica intenzivnih deoba u srednjem crevu pčela, i *N. apis* i *N.*  
19 *ceranae* dovode do oštećenja creva i pojave dijareje kao markantnog kliničkog simptoma, sa  
20 posledičnim slabljenjem pčelinjeg društva koje može dovesti do uginuća. Predstavljani su i  
21 često suprotstavljeni stavovi mnogih istraživača koji se odnose na dominantnost nalaza *N.*  
22 *ceranae* u pčelinjim društvima, kliničke znake i uticaj infekcije na stepen preživljavanja  
23 pčelinjih zajednica. Naime, *N. apis* infekcija pokazuje nisku prevalenciju u toplijim mesecima,  
24 odnosno tokom leta i većeg dela jeseni, nešto višu krajem jeseni i tokom zime, a najviši  
25 stupanj ima u proleće, pre nego stare pčele budu zamenjene mladim. Prevalencija *N. ceranae*  
26 infekcije se različito prikazuje zavisno od klimatskih karakteristika ispitivanog područja.  
27 Ispitivanja *N. ceranae* infekcije od strane jedne grupe autora pokazuju visoku prevalenciju u  
28 toplijim klimatima, ali odsustvo sezonalnosti. Međutim, druga grupa autora u svojim  
29 rezultatima navodi prisustvo sezonalnosti i generalno nisku prevalenciju tokom godine. Na  
30 osnovu ispitivanja učestalosti infekcije u Srbiji, navodi se prisustvo sezonalnosti (nalik  
31 pomenutoj sezonalnosti kod *N. apis* infekcije) uz visoku opštu prevalenciju tokom cele godine  
32 (73 – 98%). Dokazivanje prisustva obe vrste mikrosporidija u pčelinjim zajednicama se  
33 zasniva na maceriranju abdomena uzorkovanih pčela i detekciji spora prisutnih u maceratu  
34 primenom mikroskopskog pregleda. Na ovaj način je moguće utvrditi postojanje infekcije  
35 samo ukoliko je u pojedinačnim pčelama prisutno više od 50000 spora po pčeli, a zbog  
36 sličnosti u građi i veličini spora, upotreba svetlosne mikroskopije pokazuje izuzetno slabu  
37 pouzdanost u diferencijaciji *N. apis* i *N. ceranae* u ispitujućem materijalu. Primenom osetljivih  
38 molekularnih tehnika, kao što je lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase Chain  
39 Reaction, PCR) moguće je utvrditi prisustvo mikrosporidijalne DNK u ispitujućem materijalu i  
40 posledično izvršiti vrsta-specifičnu diferencijaciju čak i pri nižem intenzitetu infekcije (manje od  
41 50000 spora po pčeli).

42 U podpoglavljju koje se odnosi na viruse koji mogu izazvati poremećaje zdravstvenog stanja  
43 pčela, navodi se do sada otkriveno prisustvo više od 22 vrste virusa u pčelinjim društvima. U  
44 ovom podpoglavljju su opisane karakteristike 7 najčešće detektovanih RNK virusa u pčelama:  
45 virus crnih matičnjaka (eng. Black Queen Cell Virus - BQCV), virus deformisanih krila (eng.  
46 Deformed Wing Virus - DWV), virus mešinastog legla (eng. Sacbrood Virus - SBV), virus  
47 hronične paralize pčela (eng. Chronic Bee Paralysis Virus -CBPV), virus akutne paralize  
48 pčela (eng. Acute Bee Paralysis Virus - ABPV), kašmirski pčelinji virus (eng. Kashmir Bee  
49 Virus - KBV) i izraelski virus akutne paralize pčela (eng. Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV).  
50 Prikazane su karakteristike njihovih genoma, rasprostranjenost u pčelinjim društvima širom  
51 sveta, povezanost sa pčelinjim krpeljom *V. destructor*, posledice infekcije na pojedinačne  
52 pčele i pčelinje društvo, kao i dijagnostičke metode kojima se detektuje njihovo prisustvo u  
53 ispitujućem materijalu. Akcenat je stavljen na 4 virusa koji mogu dovesti do težih poremećaja  
54 zdravstvenog stanja pčelinjih društava i njihovog posledičnog uginuća, i to virus deformisanih  
55 krila, virus akutne paralize pčela, virus hronične paralize pčela i virus mešinastog legla.  
56 Naglašena je činjenica da ova četiri virusa egzistiraju i koegzistiraju u pčelinjim društvima ne  
57 izazivajući nikakve vidljive promene (asimptomatske infekcije). Primena savremenih, osetljivih  
58 dijagnostičkih molekularnih tehnika, pokazala je visoku učestalost pomenute pojave.  
59 Međutim, delovanje nespecifičnih činioca sredine (klima, nedostatak kvalitetne hrane,  
60 transport i sl.) i drugih patogena pčela (*Nosema* sp., *V. destructor* i dr.) mogu inicirati

1 povećano umnožavanje virusa i pojavu vidljivih simptoma infekcije i posledično stradanje  
2 pčelinjih društava. U korak sa inovacijama iz oblasti molekularne dijagnostike, raste i  
3 mogućnost primene te sofisticirane tehnologije ne samo u otkrivanju prisustva, već i u  
4 ispitivanju nasledne osnove izazivača virusnih bolesti pčela. U podpoglavlju koje se odnosi na  
5 pregled metoda koje se koriste u detekciji i identifikaciji uzročnika virusnih infekcija pčela,  
6 navode se ograničenja klasičnih dijagnostičkih metoda poput elektronske mikroskopije i  
7 seroloških metoda (agar-gel imunodifuzioni test (AGID), indirektni imonofluorescentni test  
8 (IFA) i imunoenzimski test (ELISA)). Ograničenja se odnose na složenost samog postupka,  
9 veći utrošak vremena, nizak nivo specifičnosti koji može dovesti do pogrešnog klasifikovanja  
10 srodnih virusa, nizak nivo osetljivosti značajan u otkrivanju latentnih infekcija, kao i na cenu  
11 dijagnostičkih postupaka. Jasno je prikazana prednost molekularnih tehnika u detekciji i  
12 identifikaciji virusa u pojedinačnim i mešovitim infekcijama, naročito kod pčelinjih društava  
13 koje ne pokazuju nikakve simptome. Navode se brojni primeri upotrebe RT-PCR, real-time  
14 RT-PCR i sekvenciranja delova genoma pčelinjih virusa u cilju utvrđivanja njihovog prisustva i  
15 zastupljenosti u pčelinjim društvima širom sveta. Akcenat je stavljen na real-time RT-PCR  
16 tehnoloziju jer dokazano da je ova metoda do 100 puta osetljivija od klasične RT-PCR  
17 metode, što može biti ključno u dokazivanju latentnih virusnih infekcija. Detaljno su objašnjeni  
18 principi funkcionisanja real-time RT-PCR tehnika zasnovanih na upotrebi fluorescentnih boja,  
19 SYBR green i TaqMan proba. Posebno podpoglavlje opisuje udruženo delovanje  
20 mikrosporidija i virusa i njihov značaj u nastanku CCD-a. Na kraju poglavlja „Pregled  
21 literature“, iznet je pregled dosadašnjih istraživanja prisustva uzročnika mikrosporidijalnih i  
22 virusnih infekcija pčelinjih društava na teritoriji Srbije.

23 U poglavlju „**Cilj i zadaci istraživanja**“ navodi se da je, uzimajući u obzir malo dostupnih  
24 literaturnih podataka o prisustvu i zastupljenosti DWV i ABPV, kao i odsustvo relevantnih  
25 podataka o prisustvu SBV i CBPV kod pčelinjih društava na teritoriji Republike Srbije, cilj ove  
26 doktorske disertacije je bio da se primenom molekularno genetičkih tehnika izvrši detekcija i  
27 identifikacija uzročnika virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih zajednica koje potiču iz  
28 različitih krajeva Srbije. Pored toga, istraživanje je obuhvatilo utvrđivanje prisustva i  
29 rasprostranjenosti mikrosporidija roda *Nosema* kod ispitivanih pčelinjih zajednica, kao i  
30 njihovu zastupljenost u mešovitim, mikrosporidijalno-virusnim, infekcijama. Izvršeno je i  
31 ispitivanje uticaja regiona i jačine odabranih pčelinjih društava na distribuciju  
32 mikrosporidijalnih, virusnih i mešovitih infekcija u pčelinjim zajednicama iz Srbije. U cilju  
33 realizacije zadataka postavljenih u okviru ove doktorske disertacije, izvršeno je: prikupljanje  
34 uzoraka pčela iz pčelinjih zajednica sa reprezentativnih lokaliteta na teritoriji Srbije, pri čemu  
35 su uzorci pčela prikupljeni tokom marta, jula i oktobra meseca; obrađivanje i priprema  
36 prikupljenih uzoraka pčela za izvođenje molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike;  
37 ispitivanje pripremljenih uzoraka pčela primenom metoda PCR, RT-PCR i real-time RT-PCR  
38 na prisustvo nukleinskih kiselina mikrosporidija roda *Nosema*, virusa deformisanih krila, virusa  
39 akutne paralize pčela, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize pčela; statistička  
40 obrada dobijenih rezultata ispitivanja u pogledu raširenosti mikrosporidijalnih i virusnih  
41 infekcija pčela u ispitivanim pčelinjim zajednicama; utvrđivanje povezanosti virusnih i  
42 mikrosporidijalnih infekcija u ispitivanim pčelinjim zajednicama; i sekvenciranje umnoženih  
43 delova genoma virusa detektovanih u Srbiji i njihovo poređenje sa sekvencama virusa  
44 objavljenih u genskoj bazi podataka.

45 U poglavlju „**Materijal i metode**“ detaljno su izneti podaci o odabiru lokaliteta i podlokaliteta  
46 za uzorkovanje pčela, odabiru pčelinjih društava po lokalitetu, uzorkovanju materijala za  
47 pregled. Navedene su metode ispitivanja prisustva mikrosporidija roda *Nosema* u  
48 uzorkovanom materijalu koje uključuju: mikroskopski pregled, izolaciju i amplifikaciju  
49 mikrosporidijalne DNK, kao i vizuelizaciju PCR produkata. Prikazane su metode koje su  
50 iskorišćene u utvrđivanju prisustva RNK ispitivanih pčelinjih virusa u uzorkovanom materijalu:  
51 ekstrakcija virusne RNK, amplifikacija virusne RNK primenom real-time RT-PCR tehnike i  
52 sekvenciranje delova genoma detektovanih virusa.

53 Za potrebe uzorkovanja pčela za pregled, odabrano je 150 pčelinjih društava sa ukupno 10  
54 lokaliteta. Po 2 lokaliteta su se nalazila u severnoj, istočnoj, južnoj, zapadnoj i centralnoj  
55 Srbiji. Lokaliteti su organizovani u podlokalitete u cilju dobijanja što objektivnijih rezultata o  
56 pojavi i zastupljenosti različitih virusa u pčelinjacima na teritoriji Srbije. Uzorkovanje pčela je  
57 izvršeno na svakom podlokalitetu iz jakih, srednje jakih i slabih društava. Kriterijumi za  
58 procenu jačine društva su se odnosili na površinu legla i broj ulica pčela po košnici. Procenu  
59 jačine svakog uzorkovanog društva je izvršio autor ove disertacije. Pčelinja društva iz kojih su  
60 uzorkovane pčele nisu pokazivala kliničke simptome bolesti. Sa većine podlokaliteta pčele su

1 uzorkovane iz dva jaka, jednog srednje jakog i dva slaba društva. U ovom istraživanju  
2 izabrana su samo stacionarna pčelinja društva (društva koja se ne sele na različite paše).  
3 Uzorkovanje pčela je izvršeno u proleće, leto i jesen. Materijal za pregled na prisustvo  
4 mikrosporidijalnih uzročnika je bio uzorak od 60 pčela uzetih sa leta košnice, dok je materijal  
5 za pregled na prisustvo ispitujućih virusa bio uzorak od 40 pčela uzetih sa leta i unutrašnjosti  
6 košnice. Pčele su bile žive u trenutku uzorkovanja, stavljene na suvi led do dolaska u  
7 laboratoriju i čuvane na -20°C.

8 Detekcija prisustva mikrosporidija i virusa pčela u ispitujućem materijalu je obavljena u  
9 Laboratoriji za genetiku životinja, na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine  
10 Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta "Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u  
11 zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije  
12 gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane" (Ev. br. 46002, rukovodilac prof. dr Zoran  
13 Stanimirović). Mikroskopski pregled prethodno pripremljenih uzoraka pčela u cilju utvrđivanja  
14 prisustva spora mikrosporidija roda *Nosema* je izvršen na osnovu preporuka Svetske  
15 organizacije za zdravlje životinja (OIE). Abdomeni 60 pčela svakog uzorka su macerirani u 60  
16 ml vode, kako bi se napravio odnos 60 abdomena : 60 ml vode. Zapremina od 1 ml tako  
17 pripremljenog macerata je upotrebljena za određivanje prosečnog broja spora po pčeli  
18 pomoću Neubauer–improved hemocitometra. Prisustvo spora je beleženo u pet nesusednih  
19 kvadrata hemocitometra, pri čemu se svaki kvadrat sastoji iz 16 manjih kvadrata. Na taj način,  
20 jedna pronađena spora u  $5 \times 16 = 80$  kvadrata je ekvivalentna broju od 50000 spora po pčeli.  
21 Mikrosporidijalna DNK je izolovana iz macerata pčela primenom komercijalnog seta za  
22 ekstrakciju – „DNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen, Valencia, CA) po uputstvu proizvođača.  
23 Izolovana nukleinska kiselina je čuvana na -20°C do amplifikacije primenom PCR tehnike.  
24 Utvrđivanje prisustva i determinacija mikrosporidijalne DNK izvršena je primenom duplex-  
25 PCR metode koja omogućava istovremeno umnožavanje vrsta-specifičnih delova genoma  
26 (16S rRNK gena) vrsta *N. apis* i *N. ceranae*, odnosno njihovu diferencijaciju zahvaljujući  
27 primeni prajmera specifičnih za vrstu. Za potrebe umnožavanja delova genoma i  
28 determinacije vrste *Nosema* uzročnika, korišćeni su species-specifični prajmeri 321APIS-  
29 FOR/REV i 218MITOC-FOR/REV i *Taq* DNK polimeraza (Kapa Biosystems), dok je protokol  
30 preuzet iz prethodnih istraživanja. Nakon amplifikacije izvršena je horizontalna elektroforeza  
31 na 2% agaroznom gelu i vizuelizacija dobijenih produkata pod UV svetlom.

32 Uzorci pčela za utvrđivanje prisustva nukleinskih kiselina ispitivanih virusa su neposredno pre  
33 postupka izolacije RNK macerirani u sterilnim epruvetama, macerat je centrifugovan, a  
34 supernatant je iskorišćen kao materijal za identifikaciju virusnih nukleinskih kiselina. Izolacija  
35 virusne RNK je izvršena pomoću komercijalnog seta – „ZR Viral RNA Kit™“ (Zymo Research,  
36 Orange, CA) u skladu sa uputstvima proizvođača. Izolovana RNK je smeštena na -80°C do  
37 postupka amplifikacije primenom RT-PCR ili real-time RT-PCR. Za amplifikaciju RNK svakog  
38 pojedinačnog virusa korišćen je komercijalni set „Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen,  
39 Valencia, CA). Umnožavanje je vršeno u jednom koraku, odnosno u kontinuiranoj reakciji se  
40 odigrava prvo reverzna transkripcija a zatim umnožavanje dela genoma ciljanog virusa. Za  
41 umnožavanje dela genoma svakog pojedinačnog virusa korišćeni su specifični parovi  
42 prajmera. Za potrebe kvantifikacije umnoženog dela genoma korišćene su Taqman® probe.  
43 Svaka proba je na svom 5' kraju obeležena sa FAM fluorescentnom bojom (zeleni  
44 fluorescentni signal), a na 3' kraju sa TAMRA "quencher" bojom. Protokol amplifikacije je  
45 definisan nakon niza optimizacija. Kvantifikacija amplifikovanih produkata je omogućena  
46 beleženjem nivoa fluorescencije u vidu specifičnih dijagrama uz pomoć kompjuterskog  
47 softvera koji je obezbeđen od strane proizvođača aparata „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen,  
48 Valencia, CA). Sekvenciranje delova genoma detektovanih virusa se sastojalo iz amplifikacije  
49 nukleinskih kiselina izabranih virusa putem RT-PCR tehnike. U tu svrhu je iskorišćen protokol  
50 preporučen od strane „Francuske agencije za bezbednost hrane, zaštitu životne sredine i  
51 bezbednost na radu (ANSES)“. Sledilo je prečišćavanje PCR proizvoda iz gela, sekvenciranje  
52 dobijenih PCR proizvoda po Sanger metodi izvođenjem kapilarne elektroforeze u  
53 automatskom genetskom analizatoru 3130 (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems,  
54 SAD). Dobijene sekvence genoma DWV, ABPV, SBV i CBPV su obrađivane korišćenjem  
55 SeqScape programa (Applied Biosystems, SAD) i korigovane u Chromas Lite programu  
56 (Technelysium Pty, Ltd, Australija). Poravnavanje sekvenci nukleotida, izrada filogenetskog  
57 stabla i izračunavanje filogenetske distance je vršeno korišćenjem kompjuterskog programa  
58 MEGA 6 (Tamura i sar., 2013). Autentičnost dobijenih parcijalnih nukleotidnih sekvenci  
59 svakog od ispitivanih virusa je potvrđena putem „BLAST“ pretrage (eng. Basic Local  
60 Alignment Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) genske baze podataka (GenBank).

1 Nakon pretrage, izvršena je statistička provera genetske sličnosti dobijenih nukleotidnih  
2 sekvenci virusa pčela poreklom iz Srbije i relevantnih sekvenci virusa koje se nalaze u  
3 genskoj bazi podataka. Najpre je izvršeno sravnjivanje nukleotidnih sekvenci primenom  
4 ClustalW algoritma. Nakon toga, izvršena je filogenetska analiza primenom Maximum  
5 Parsimony i Neighbor-Joining algoritama.

6 Normalnost raspodele testiranih parametara je testirana matematičkim i grafičkim metodama  
7 (koeficijent varijacije, mere oblika raspodele, Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovi,  
8 histogram). Za deskripciju podataka korišćeni su aritmetička sredina i standardna devijacija  
9 (normalno raspodeljeni), kao i medijana i opseg (podaci koji ne podležu normalnoj raspodeli).  
10 Učestalosti su prikazivane kao apsolutne i relativne frekvencije izražene u procentima. Za  
11 poređenje dve grupe parametara korišćeni su studentov t-test, kao i Man-Whitney U test u  
12 zavisnosti od distribucije podataka. Za poređenje više od dve grupe korišćeni su ANOVA (kao  
13 parametarska metoda) sa Tuckey PostHoc metodom, kao i Kruskal-Wallis (kao  
14 neparametarska alternativa) koga je pratio Mann-Whitney za analizu parova. Za poređenje  
15 učestalosti korišćeni su Pearsonov hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće, a tamo  
16 gde zbog velikog broja kategorija i malih učestalosti nije bilo adekvatno primeniti predhodna  
17 dva navedena testa, izvdena je Monte Carlo simulacija sa 95% intervalom poverenja na 1000  
18 uzoraka.

19 „**Rezultati istraživanja**“ su prikazani kroz 52 tabele, 12 grafikona i 2 slike, uz prateće  
20 komentare. U delu rezultata koji se odnosi na utvrđivanje prisustva i zastupljenosti  
21 mikrosporidija pčela, navodi se da je nakon mikroskopskog pregleda 150 uzoraka pčela,  
22 prisustvo spora zabeleženo u 72% pregledanih uzoraka. Najviše uzoraka u kojima su  
23 detektovane spore je poticao iz severne Srbije (37 zoraka, 84,1%). Nakon mikroskopskog  
24 pregleda, svi ispitivani uzorci pčela su, bez obzira na prisustvo spora mikrosporidija,  
25 analizirani primenom molekularnih metoda. Rezultati PCR analiza pokazuju prisustvo  
26 mikrosporidijalne DNK u 132 uzorka, odnosno u 88 % ukupno analiziranih uzoraka. Rezultati  
27 poređenja dve pomenute metode pokazuju da je u 24 uzorka u kojima mikroskopskim  
28 pregledom nije utvrđeno prisustvo spora, utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidija roda  
29 *Nosema*. Od ukupnog broja *Nosema* pozitivnih uzoraka, prisustvo DNK *N. ceranae* je  
30 zabeleženo u 100 % *Nosema* pozitivnih uzoraka, dok prisustvo DNK *N. apis* nije utvrđeno ni u  
31 jednom ispitivanom uzorku. Primenom  $\chi^2$  testa nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti  
32 u regionalnoj distribuciji *Nosema* mikrosporidija. Prisustvo spora je zabeleženo u 45 uzoraka  
33 poreklom iz jakih, 23 uzorka iz srednje jakih i 40 uzoraka iz slabih pčelinjih društava.  
34 Primenom tehnike PCR, prisustvo DNK *N. ceranae* je zabeleženo u 55 jakih društava, 28  
35 srednje jakih i 49 slabih društava. Primenom  $\chi^2$  testa nije utvrđeno prisustvo statističke  
36 značajnosti u uticaju jačine pčelinjeg društva na pojavu *Nosema* mikrosporidija. Poređenjem  
37 vrednosti prosečnog broja spora po pčeli primenom Kurskal-Wallis testa, za uzorke koji potiču  
38 iz severne, južne, istočne, zapadne i centralne Srbije utvrđena je statistička značajnost na  
39 nivou  $p < 0,001$ . Testiranjem sume rangova primenom Mann-Whitney testa, utvrđena je  
40 statistički značajna razlika ( $p = 0,048$ ) u prosečnom broju spora po pčeli među uzorcima iz  
41 severne i istočne Srbije, statistički veoma značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između uzoraka iz  
42 severne i zapadne Srbije, statistički značajna razlika ( $p = 0,022$ ) između uzoraka iz južne i  
43 zapadne Srbije, i statistički značajna razlika ( $p = 0,002$ ) između uzoraka iz zapadne i centralne  
44 Srbije.

45 Prisustvo i zastupljenost DWV, ABPV, SBV i CBPV u uzorkovanom materijalu poreklom iz  
46 pčelinjih društava u kojima kliničkim pregledom nisu zabeleženi simptomi virusnih infekcija,  
47 ispitivano je upotrebom real-time RT-PCR metode bazirane na „TaqMan“ probama. Prisustvo  
48 RNK pčelinjih virusa je utvrđeno u 131 uzorku, što čini 87,33 % svih obrađenih uzoraka.  
49 Zastupljenost RNK DWV je zabeležena u 74 %, ABPV u 49,3 %, SBV u 24 % i CBPV u 6,7 %  
50 ukupno ispitivanih uzoraka. Posmatrano po regionima, DWV je najzastupljeniji u pčelinjacima  
51 centralne Srbije (83,3 %) a najmanje zastupljen u severnoj Srbiji (70,5 %); ABPV je  
52 najprisutniji u pčelinjacima severne (68,2 %), a najmanje zastupljen u pčelinjacima centralne  
53 Srbije (16,7 %). Primenom  $\chi^2$  testa utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ( $p = 0,001$ ) u  
54 regionalnoj distribuciji svih ispitujućih virusa, osim virusa deformisanih krila. U pogled  
55 zastupljenosti mešoviti virusnih infekcija, primenom  $\chi^2$  testa, uz upotrebu Monte Carlo  
56 simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je  
57 prisustvo statističke značajnosti ( $p < 0,05$ ) u regionalnoj distribuciji sledećih kombinacija virusa:  
58 ABPV – SBV i DWV – ABPV – SBV. Posmatrano po jačini pčelinjeg društva, RNK DWV je bio  
59 najzastupljeniji nalaz u jakim (78 %), a najmanje zastupljen u srednje jakim društvima (68 %);  
60 ABPV je najviše bilo u srednje jakim (62,5 %) a najmanje u slabim društvima (42,4 %); SBV je

1 najučestaliji nalaz u slabim društvima (25,4 %) a najmanje učestao u jakim društvima (22 %);  
2 CBPV je najfrekventniji u srednje jakim društvima (9,4 %), a najmanje frekventan kod jakih  
3 društava (3,4 %). ). Statističkom obradom rezultata ( $\chi^2$  test) nije utvrđeno prisustvo statističke  
4 značajnosti u pojavi bilo kojeg od ispitivanih virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.  
5 Takođe, primenom  $\chi^2$  testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i  
6 nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u  
7 regionalnoj distribuciji kombinacija ispitivanih virusa. Intenzitet infekcije izazvane sa DWV,  
8 ABPV, SBV i CBPV je iskazan kroz visinu Ct (eng. cycle threshold) vrednosti, odnosno broj  
9 ciklusa u kome signal fluorescencije, tokom real time RT-PCR prelazi liniju praga detekcije.  
10 Visina Ct vrednosti je pokazatelj koji je obrnuto proporcionalan količini detektovane virusne  
11 RNK u svakom ispitujućem uzorku. Drugim rečima, što je Ct vrednost niža, odnosno, što je  
12 broj ciklusa u kome fluorescencija prelazi prag detekcije niži, to je količina detektovane  
13 virusne RNK u uzorku veća. Veća količina virusne RNK ukazuje na veću opterećenost čitavog  
14 društva detektovanim virusom/virusima u ispitujućem uzorku. Primenom ANOVA testa,  
15 utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u  
16 kojima je utvrđeno prisustvo RNK ispitivanih virusa, ne postoji statistički značajna razlika u  
17 visini Ct vrednosti. Ispitivanje uticaja jačine pčelinjeg društva na odnose DWV / ABPV i DWV /  
18 SBV u uzorcima u kojima je utvrđeno istovremeno prisustvo ovih kombinacija virusa, izvršeno  
19 je kroz poređenje količnika njihovih Ct vrednosti. Primenom ANOVA testiranja, nije utvrđeno  
20 postojanje statističke značajnosti u prosečnim vrednostima za količnik Ct vrednosti pomenutih  
21 kombinacija virusa između jakih, srednje jakih i slabih društava. Najčešće identifikovana  
22 kombinacija virusa u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije je  
23 DWV + ABPV sa učešćem od 48,33 %. Posmatrajući distribuciju mešovitih (mikrosporidijalno-  
24 virusnih) infekcija, primenom  $\chi^2$  testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih  
25 učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke  
26 značajnosti ( $p < 0,001$ ) u regionalnoj distribuciji mešovitih infekcija. Primenom  $\chi^2$  testa, nije  
27 utvrđeno prisustvo statistički značajnog uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu mešovitih  
28 infekcija sa jednom i više vrsta virusa.

29 Nakon potvrde prisustva RNK ispitivanih virusa u uzorcima pčela, izvršena je genetska  
30 identifikacija i filogenetska analiza virusa pčela iz Srbije. Za sekvenciranje je odabrano 9  
31 uzoraka pozitivnih na prisustvo RNK DWV, 2 uzorka pozitivna na prisustvo RNK ABPV, 2  
32 uzorka pozitivna na prisustvo RNK CBPV i 3 uzorka pozitivna na prisustvo RNK SBV. Nakon  
33 sekvenciranja, u gensku bazu podataka je prijavljeno 8 različitih sekvenci DWV, 1 sekvenca  
34 ABPV, 1 sekvenca CBPV i 1 sekvenca SBV iz Srbije. Primenom kompjuterskog programa  
35 MEGA 6 i Maximum Likelihood analize sekvenci, utvrđena je genetska sličnost sekvenci iz  
36 Srbije sa sekvencama iz Evrope i ostatka sveta. „BLAST“ pretraga je pokazala podudarnost  
37 od 93 – 99% nakon poređenja sekvenci virusa iz Srbije sa sekvencama koje su prijavljene u  
38 genskoj bazi podataka od strane autora širom sveta.

39 U poglavlju „Diskusija“ dobijeni rezultati su protumačeni i poređeni sa rezultatima drugih  
40 istraživača koji su obrađivali sličnu problematiku.

41 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj**  
42 **disertaciji):** Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti  
43 sledeće:  
44

- 45 1. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali veću osetljivost metode PCR u odnosu na  
46 mikroskopski pregled u otkrivanju mikrosporidijalnih infekcija pčelinjih društava.
- 47 2. Prisustvo mikrosporidija iz roda *Nosema* je ustanovljeno kod 72% od ukupno 150  
48 ispitanih uzoraka poreklom od pčelinjih društava sa teritorije Republike Srbije.
- 49 3. Prisustvo DNK mikrosporidija iz roda *Nosema* utvrđeno je kod 88% ispitanih uzoraka,  
50 odnosno kod 18% uzoraka u kojima mikroskopskim pregledom nije utvrđeno  
51 prisustvo spora.
- 52 4. U svim ispitivanim uzorcima u kojima je potvrđena mikrosporidijalna infekcija  
53 primenom PCR tehnike je utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidije *Nosema ceranae*.  
54 Ni u jednom ispitivanom uzorku nije utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidije *Nosema*  
55 *apis*.

- 1 5. Jačina pčelinjeg društva ne utiče na pojavu mikrosporidijalnih infekcija u Srbiji. Nije  
2 utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji uzoraka pozitivnih  
3 na prisustvo mikrosporidija *Nosema* vrste, što implicira da pojava mikrosporidijalnih  
4 infekcija pčela u Srbiji ne zavisi od regiona uzorkovanja.
- 5 6. Primenom real-time RT-PCR metode zasnovane na Taqman probama kod 87,33 %  
6 uzoraka poreklom sa teritorije Srbije je utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina  
7 pčelinjih virusa. Zastupljenost RNK virusa deformisanih krila je utvrđena u 74 %,  
8 virusa akutne paralize pčela u 49,3 %, virusa mešinastog legla u 24 % i virusa  
9 hronične paralize u 6,7 % ispitivanih uzoraka. Odsustvo nukleinskih kiselina  
10 ispitivanih virusa pčela je zabeleženo u 12,67 % obrađenih uzoraka.
- 11 7. Zastupljenost virusa akutne paralize, virusa mešinastog legla i virusa hronične  
12 paralize značajno zavisi od regiona, dok u slučaju virusa deformisanih krila nije  
13 zabeležena značajnost u regionalnoj distribuciji. Jačina pčelinjeg društva ne utiče na  
14 distribuciju ispitivanih virusa, kao ni na intenzitet virusnih infekcija iskazan kroz Ct  
15 vrednost.
- 16 8. Prisustvo RNK više od jednog virusa je zabeleženo u 56,67 % uzoraka iz Srbije.
- 17 9. Zastupljenost mešoviti (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija značajno zavisi od  
18 regiona uzorkovanja. Nije utvrđen statistički značajan uticaj jačine pčelinjeg društva  
19 na zastupljenost i karakter mešoviti infekcija.
- 20 10. Rezultati filogenetske analize pokazuju odgovarajući stepen genetske sličnosti 8  
21 različitih sekvenci virusa deformisanih krila, 1 sekvence virusa akutne paralize pčela,  
22 1 sekvence virusa hronične paralize pčela i 1 sekvence virusa mešinastog legla iz  
23 Srbije sa virusima utvrđenim u pčelinjim društvima širom sveta.
- 24 11. Informacije o nukleotidnom sastavu sekvenci pčelinjih virusa iz Srbije pružaju uvid u  
25 promene na posmatranim delovima genoma i upotpunjuju filogenetske analize  
26 evropskih sojeva ispitivanih virusa.

27

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

31 Rezultati doktorske disertacije su u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima, a zaključci  
32 proistekli iz rezultata postavljeni su pravilno.

33

## 34 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

35

### 36 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

37 Doktorska disertacija je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi.

### 38 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

39 Konačno predat rad sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

### 40 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

41 Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje prisustva i zastupljenosti četiri virusa u  
42 pčelinjim društvima na teritoriji Srbije izvršeno primenom real-time RT-PCR tehnologije.  
43 Ujedno, ova disertacija sadrži rezultate molekularne karakterizacije četiri pčelinja virusa  
44 poreklom iz Srbije, kao i rezultate filogenetske analize nastale poređenjem nukleotidnih  
45 sekvenci pčelinjih virusa iz Srbije sa sekvencama virusa iz Evrope i sveta. Rezultati doktorske  
46 disertacije potvrđuju odsustvo DNK mikrosporidije vrste *N. apis* i dominantno prisustvo DNK  
47 mikrosporidije *N. ceranae* u pčelinjim društvima na teritoriji Srbije. U ovom radu je po prvi put  
48 utvrđen regionalni uticaj i uticaj jačine pčelinjih društava na prisustvo i zastupljenost:  
49 mikrosporidija pčela; pojedinačnih virusa i kombinacija virusa u mešovitim virusnim  
50 infekcijama; kao i mešoviti mikrosporidijalno – virusnih infekcija u pčelinjim društvima na  
51 teritoriji Srbije. Dobijeni rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajan doprinos  
52 istraživanjima ovog tipa izvršenim u Evropi i svetu jer upotpunjuju opštu sliku o prisustvu,  
53 zastupljenosti i molekularnoj karakterizaciji virusa prisutnih u pčelinjim zajednicama, kao i

1 povezanosti pojave mikrosporidija pčela i određenih vrsta pčelinjih virusa u asimptomatskim  
2 pčelinjim društvima. Specifičnost i osetljivost primenjenih real-time RT-PCR protokola u  
3 detekciji pčelinjih virusa, u ovom radu omogućavaju njihovu praktičnu primenu u rutinskoj  
4 kontroli prisustva i zastupljenosti virusa u pčelinjim društvima.

5 **IX PREDLOG:**

6  
7 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**  
8 **ponuđenih mogućnosti):**

- 9 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana  
10 - ~~da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu~~  
11 - ~~da se doktorska disertacija odbije~~

12  
13  
14 DATUM: **09. 04. 2015. godine**

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

15  
16 Prof. dr Zoran Stanimirović  
17 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

18  
19  
20  
21 Prof. dr Sonja Radojičić  
22 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

23  
24  
25  
26 Prof. dr Jevrosima Stevanović  
27 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

28  
29  
30  
31 Prof. dr Jakov Nišavić  
32 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 Dr Dejan Vidanović, naučni saradnik  
40 Veterinarski specijalistički institut – Kraljevo