

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
„Присуство и раширеност вируса животиња и људи у површинским водама
Војводине“
кандидат: Госпава Лазих

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

1. Датум и орган који је именовано комисију
Наставно научно веће Природно-математичког факултета Нови Сад, 30.06.2016.
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:
 - **др Весна Милошевић**, редовни професор, Микробиологија са паразитологијом и имунологијом, 26.01.2012., Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду; Институт за јавно здравље Војводине, председник комисије
 - **др Михајла Ђан**, ванредни професор, Генетика, 17.07.2013., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан
 - **др Сава Лазих**, научни саветник, Микробиологија и заразне болести - имунологија и вирусологија, 07.10.2004., Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“; ванредни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, члан
 - **др Петар Кнежевић**, ванредни професор, Микробиологија, 01.07.2015., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор
 - **др Тамаш Петровић**, научни саветник, Микробиологија и заразне болести - имунологија и вирусологија, 26.04.2016., Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, ментор

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Име, име једног родитеља, презиме:
Госпава (Госпа) Лазих
2. Датум рођења, општина, држава:
07.11.1982., Сремска Митровица, Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив:
Природно-математички факултет, дипломске академске студије биолошког профила–мастер (смер Микробиологија), Дипломирани биолог-мастер (Микробиологија)
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија
2011. година, Доктор наука - Биолошке науке
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

„Присуство и раширеност вируса животиња и људи у површинским водама Војводине“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Више од 100 врста вируса људи и животиња се излучује у спољашњу средину. Присуство ових вируса у површинским водама рефлектује фекалну контаминацију и указује на опасност за здравље људи и животиња. На подручју Србије се не прати присуство патогених вируса у површинским водама, па чак ни у водама за пиће, а није успостављена ни методологија ових испитивања. Сходно томе, циљ дисертације је да се утврди и анализира присуство анималних и хуманих вируса у површинским водама применом најсавременијих метода концентровања и детекције вируса. У оквиру дисертације испитано је присуство следећих вируса у површинским водама на територији Војводине: хуманих аденовируса (*HAdV*); норовируса (*NoV*) и хепатитис А вируса (*HAV*), аденовируса свиња (*PAdV*), полиомавируса говеда (*BPyV*) и хепатитис Е вирус (*HEV*).

Испитано је укупно 108 узорак површинских и отпадних вода који су прикупљани од октобра 2012. године до јуна 2014. године. У раду су примењене најсавременије методе концентровања и детекције вируса у води, које се у Србији нису користиле за ову намену. Спроведеним испитивањима доказано је да су анимални и хумани вируси присутни у површинским водама на подручју Војводине. Најчешће детектован вирус у површинским водама је хумани аденовирус (42,4%), а потом норовируси *GII* и *GI* (40,4% и 15,2%), аденовирус свиња (11,1%), полиомавирус говеда (7,1%) и хепатитис Е вирус (3,0%). У укупно 9 тестираних узорака градске канализације најчешће је детектован *HAdV* (44,4%), *NoV GI* и *GII* (66,7% и 22,2%), *BPyV* је детектован у само једном од 9 узорака, а нити у једном нису детектовани *PAdV* и *HEV*. Хепатитис А вирус није детектован у узорцима, а експериментално је потврђено да су методе применљиве и за детекцију овог вируса. На основу резултата приноса процесне контроле и утврђеног присуства вируса у узорцима, закључено је да се ове методе могу веома успешно користити за детекцију вирусне контаминације површинских вода. Извршена је и генотипизација вируса из одабраних узорака методом секвенцирања дела вирусног генома. Индиректно је потврђено да су инфекције детектованим вирусима присутне у популацији животиња и људи. Присуство вируса у површинским водама и узорцима градске канализације одражава инфективни статус становништва, али представља и значајан ризик за здравље животиња и људи на подручју које гравитира испитаним водама.

Докторска дисертација „Присуство и раширеност вируса животиња и људи у површинским водама Војводине“ кандидата Госпаве Лазић написана је на 209 страна текста, од чега је садржај тезе подељен у 9 поглавља:

1. Увод – 2 стране
2. Преглед литературе – 49 страна
3. Циљ истраживања – 1 страна
4. Материјал и методе – 42 стране
5. Резултати – 39 страна
6. Дискусија – 31 страна
7. Закључак – 3 стране
8. Литература – 21 страна и
9. Прилог – 2 стране

Поред тога, у докторској дисертацији се налазе и садржај, биографија кандидата, списак фотографија, табела и коришћених скраћеница, као и кључна документацијска

информација на српском и енглеском језику. Рад садржи 74 слике, 15 табела, 324 литературних навода и 1 прилог.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу УВОД (2 стр.) кандидаткиња је јасно изложила проблематику присуства вируса животиња и људи у површинским водама.

Поглавље ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ (49 стр.) садржи опис квалитета и улоге воде у природи, као и податке о вирусној контаминацији површинских вода. У овом поглављу дат је детаљан преглед карактеристика хуманих аденовируса, норовируса, хепатитис А вируса, аденовируса свиња, полиомавируса говеда и хепатитис Е вирус, са посебним освртом на њихов значај за јавно здравље, преношење и преживљавање у животnoj средини. Такође је дат детаљан опис метода за утврђивање присуства ових вируса у површинским водама. На самом крају овог поглавља обрађена је и легислатива која се тиче квалитета површинских вода. **Поглавље Преглед литературе је написано систематично и пружа свеобухватни увид у истраживану проблематику, на основу чега комисија позитивно оцењује ово поглавље.**

Имајући у виду литературне податке наведене у претходном поглављу, постављен је основни ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА (1 стр.), који је био да се утврди и анализира присуство анималних и хуманих вируса у површинским водама на подручју АП Војводине (Република Србија), применом најсавременијих метода концентровања и молекуларне детекције вируса у површинским водама, а које се припремају или се тек уводе у програме надзора присуства патогених вируса у води у неким економски високо развијеним земљама. Остваривање постављеног циља ће дати одговоре на следећа питања: да ли се примењене методе могу користити за рутински надзор вирусолошке исправности површинских вода, да ли су анимални и хумани вируси присутни у површинским водама на подручју Војводине, колика је њихова преваленца и да ли постоји ризик за здравље животиња и људи на подручју које гравитира испитаним водама? **Комисија оцењује да је циљ дисертације јасно дефинисан.**

Поглавље МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (42 стр.) садржи детаљан опис примењених метода концентровања вируса и молекуларних метода за детекцију вируса. Кандидаткиња је јасно описала методе узорковања, уз текстуални и сликовит опис локалитета узорковања. У другом потпоглављу су описани поступци концентровања вируса, екстракције нуклеинских киселина, детекције и типизације вируса, као и опис примењених метода статистичке обраде података. **Комисија сматра да су коришћени материјал и методе савремени, да су довољно детаљно описани, прецизни и да су адекватни за добијање валидних резултата.**

РЕЗУЛТАТИ (39 стр.) рада су изложени у петом поглављу кроз 6 потпоглавља. Резултати су представљени текстуално и табеларно (10 табела) уз илустровани приказ са 22 слике. У првом потпоглављу је систематично и јасно приказано присуство сваког вируса појединачно. Преостала потпоглавља обухватају резултате утврђене преваленце вируса по испитаним локалитетима и врстама површинских вода методом *real-time PCR* и *real-time RT-PCR*, као и потврду добијених резултата применом класичних метода ланчане реакције полимеразе (*PCR*), реверзне транскрипције-ланчане реакције полимеразе (*RT-PCR*) и *nested PCR*, укључујући и резултате секвенцирања и филогенетске анализе детектованих генотипова. Поред тога, приказани су и резултати квантификације вируса присутних у узорцима. Статистичка обрада података је адекватна и примерена истраживачком задатку.

Комисија сматра да је кандидаткиња изузетно прегледно и систематично представила резултате истраживања, који омогућавају реализацију постављених циљева.

У делу ДИСКУСИЈА (31 стр.), кандидаткиња је интерпретирала добијене експерименталне резултате и дала њихову критичку анализу. У оквиру овог дела, разматрана је преваленца у површинским и градским канализационим водама сваког вируса појединачно, као и преваленца вируса у популацији људи и животиња, која је у раду утврђена индиректним путем. Такође је дискутован и утврђени генотип сваког вируса, а дата је анализа квантитативних резултата. Добијене резултате кандидаткиња је упоредила са доступним литературним подацима претходних студија. Дискусија је исцрпна и научно утемељена, што указује на кандидаткињино завидно познавање проучаване проблематике. **Комисија сматра да је у овом поглављу кандидаткиња детаљно и свеобухватно сагледала добијене резултате и протумачила их у складу са подацима доступним у литератури.**

У оквиру поглавља ЗАКЉУЧАК (3 стр.) , **на основу добијених резултата, правилно и логички је изведено 8 закључака, који су формулисани јасно и разумљиво и у складу су са постављеним циљем докторске дисертације.**

Осмо поглавље представља списак ЛИТЕРАТУРЕ (21 стр.). Укупно је цитирано 324 литературне јединице, које обухватају библиографске податке везане за хумане и анималне вирусе у површинским и отпадним водама, као и методе које се користе за њихову детекцију. Највећи број литературних навода подразумева радове објављене у часописима међународног значаја. **Комисија позитивно оцењује избор и цитирње литературе.**

Девето поглавље ПРИЛОЗИ (2 стр.) садржи један прилог, односно веома детаљно приказану табелу са подацима о вирусима који су први пут детектовани у Србији и чија је парцијална секвенца генома депонована у Банку гена (*NCBI GenBank*).

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

Рад у истакнутом међународном часопису, М22

1. **Lazić G.**, Grubač S., Lupulović D., Bugarski D., Lazić S., Knežević P., Petrović T.: Presence of Human and Animal Viruses in Surface Waters in Vojvodina Province of Serbia. Food and Environmental Virology, 7, 149-158, 2015, IF 2,338.

Рад саопштен на скупу међународног значаја, штампан у целини, М33

1. **Lazić G.**, Grubač S., Bugarski D., Lupulović D., Lazić S., Knežević P., Petrović T.: Detection of Viruses in Water Environments in Serbia. Proceedings, IWA 7th Eastern European Young

Water Professionals Conference Belgrade, Serbia, 17-19 September, 2015, Beograd, IWA, 2015, 122-129.

2. **Lazić G.**, Grubač S., Bugarski D., Lupulović D., Lazić S., Knežević P., Petrović T.: Viruses in environment: Situation in Vojvodina province of Serbia .Proceedings, First International Symposium of Veterinary Medicine 'One Health - New Challenges' (ISVM2015), Vrdnik, May 21-23, 2015, editor in chief Tamaš Petrović, Novi Sad, Scientific Veterinary Institute 'Novi Sad', 2015, 295-300.

3. **Lazić G.**, Lupulović D., Grubač S., Lazić S., Petrović T.: Human and animal viruses detection in surface waters in Serbia = Utvrđivanje prisustva humanih i animalnih virusa u površinskim vodama u Srbiji. Environmental protection of urban and suburban settlements: Proceedings, XVII International Eco-Conference, 25-28th September 2013, Novi Sad, 137-145.

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На подручју Србије се не прати присуство патогених вируса људи и животиња у површинским водама, као ни у испустима градских канализационих вода у површинске воде, па чак ни у водама за пиће. У складу са тим није успостављена одговарајућа методологија нити у једној институцији у Србији. По први пут у Србији, у површинским водама на територији Аутономне Покрајине Војводине, утврђено је и анализирано присуство вируса људи (хуманог аденовируса (*HAdV*), норовируса геногрупе 1 и 2 (*NoV GI* и *NoV GII*) и хепатитис А вируса (*HAV*)), вируса животиња (аденовируса свиња (*PAdV*) и полиомавируса говеда (*BPyV*)), као и зоонотских вируса (хепатитис Е вируса (*HEV*)). На основу добијених резултата закључено је следеће:

1. Анимални и хумани вируси су присутни у површинским водама на подручју Војводине. На присуство вируса испитано је укупно 108 узорака површинских (99) и градских канализационих вода (9) у различитим сезонама, од октобра 2012. године до јуна 2014. године. Утврђено је присуство скоро свих испитиваних вируса, односно *HAdV*, *NoV GI* и *GII*, *PAdV*, *BPyV* и *HEV*. Једино *HAV* није детектован нити у једном од анализираних узорака.

2. Најчешће детектован вирус, односно вирус са највећом преваленцом у испитаним површинским водама и градској канализацији је био *HAdV*. Преваленца *HAdV* је износила 42,4% (42/99) у узорцима површинских вода. Преваленца *NoV GII* и *GI* је износила 40,4% (40/99) и 15,2% (15/99), *PAdV* 11,1% (11/99), *BPyV* 7,1% (7/99), а *HEV* је била 3,0% (3/99). У укупно 9 тестираних узорака градске канализације преваленца *HAdV* је износила 44,4% (4/9), *NoV GII* и *GI* 66,7% (6/9) и 22,2% (2/9). *BPyV* је детектован у само једном од 9 узорака градске канализације, а нити у једном нису детектовани *PAdV* и *HEV*. Такође, хепатитис А вирус није детектован нити у једном од анализираних површинских вода, нити у узорцима градске канализације.

3. У испитаним површинским водама и узорцима градске канализације у којима је детектовано присуство вируса је израчунат број *PCR* детектабилних јединица (*PDU*) вируса у 1 литру узорка воде, са интервалом поузданости (*CI*) 95%. У узорцима површинских вода број *PDU/L* утврђених вируса се кретао од 48 (95% *CI*: 4-369) до $6,1 \times 10^3$ (95% *CI*: 406-70.9x10³), а у узорцима градске канализације од 96 (95% *CI*: 8-477) до $6,1 \times 10^3$ (95% *CI*: 406-70.9x10³).

4. Како би се додатно потврдила успешност, осетљивост и специфичност коришћених савремених метода концентровања и молекуларних метода детекције анималних и хуманих вируса у површинским и канализационим водама, извршена је типизација једног броја детектованих вируса. Анализом секвенцираних делова генома *HAdV* из 6 узорака је

потврђено да узорци припадају *HAdV* групи Ф, од чега три узорка припадају типу 40, а остала три типу 41. Типизацијом два узорка *NoV* је потврђено присуство оба генотипа овог вируса, односно и *NoV GI* и *NoV GII*. Оба детектована *HEV* су типизирани као *HEV* генотип 3, типизирани део генома *PAdV* је сврстан у *PAdV* тип 5, а *BPyV* је анализом секвенце сврстан у *BPyV* генотип 1.

5. На основу резултата приноса процесне контроле (мишији норовирус) и детектованих вируса, јасно је да се савремене методе концентровања вируса из узорка воде (филтрација кроз стаклену вуну, елуција говеђим екстрактом и концентровање центрифугирањем уз измену рН вредности) и коришћене молекуларне методе детекције (екстракција нуклеинских киселина помоћу магнетних честица, реал-тима *RT-PCR* и *real-time PCR (RT-qPCR* и *qPCR*)) могу веома успешно користити за утврђивање вирусне контаминације површинских вода. Од свих испитиваних вируса, једино *HAV* није детектован нити у једном од анализираних површинских вода, нити у узорцима градске канализације. Међутим, тестирањем стандарда *HAV*, као и вештачком контаминацијом узорка површинске воде, потврђено је да је методологија и за детекцију *HAV* у површинским водама била адекватна, као и за детекцију осталих детектованих вируса.

6. Савремене методе концентровања и детекције вируса у узорцима површинских вода се веома успешно могу користити за рутински надзор вирусолошке исправности површинских вода, а нарочито уколико то у будућности постане захтев контроле контаминације животне средине.

7. Резултати индиректно указују на присуство инфекција људи и животиња детектованим вирусима на испитиваном подручју. Присуство вируса у површинским водама и узорцима градске канализације указује да су испитивани вируси *HAdV*, норовирус *GI* и *GII*, аденовирус свиња, полуомавирус говеда и хепатитис Е вирус циркулисали у популацији људи и животиња у периоду од октобра 2012. до јуна 2014. године. Једино *HAV* није детектован нити у површинским, нити у канализационим водама, што указује на чињеницу да је преваленца *HAV* у хуманој популацији у испитиваном периоду на испитиваном била изузетно ниска и испод границе детекције.

8. Број и преваленца детектованих патогених ентеричких врста вируса у површинским водама у АП Војводини (Србија) су недвосмислено потврдили да постоји ризик за здравље животиња и људи на подручју које гравитира испитаним површинским водама. Ризик за јавно здравље и здравље животиња је посебно значајан на подручјима и локалитетима где се испитиване површинске воде користе у пољопривредне и рекреативне сврхе.

Резултати истраживања указују на неопходност континуираног праћења вирусолошке исправности површинских вода, а у циљу правовременог упозоравања становништва и превенције инфекција. Резултати такође указују на неопходност пречишћавања отпадних вода у циљу смањења вирусног оптерећења површинских вода на територији Аутономне Покрајине Војводине.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат Госпава Лазих је у складу са поствљеним циљевима применила најсавременије методе детекције вируса у узорцима из природне средине и добила веома комплексне резултате. Поред квалитативних резултата, представљени су и квантитативни подаци о присуству вируса, као и парцијалне секвенце генома одабраних вируса из узорка. Сви резултати су адекватно приказани, у форми прегледних табела и слика. Добијени подаци су правилно обрађени и адекватно протумачени. Кандидат је објективно и критички

упоредио добијене резултате са резултатима других аутора. Кроз детаљну дискусију резултата изведени су валидни закључци, који дају директне одговоре на постављене циљеве докторске дисертације. На основу изнетог комисија даје **позитивну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.**

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Комисија оцењује да је докторска дисертација у потпуности урађена и написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе као што су адекватан увод и преглед литературних података, затим дефинисање циљева истраживања, опис методологије рада, јасан и систематичан приказ резултата и њихову адекватну анализу и дискусију. Закључци су правилно изведени на основу добијених резултата и дате су смернице за даља истраживања у области која је предмет дисертације.

Комисија закључује да дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Докторска дисертација кандидата Госпаве Лазић садржи резултате који представљају прве доступне податке о присуству хуманих аденовируса, норовируса, хепатитис А вируса, аденовируса свиња, полиомавируса говеда и хепатитис Е вируса у површинским водама АП Војводине, као и Републике Србије. На подручју Србије се не прати присуство вируса људи и животиња у површинским водама, па чак ни у водама за пиће, а добијени резултати представљају изузетно добру основу за будућа слична истраживања. На нашим просторима до сада није успостављена ни методологија ових испитивања, а најсавременије методе концентровања и молекуларно биолошке методе детекције вируса, коришћене у овој дисертацији, показале су се као веома погодне за успостављање мониторинга присуства вирусне контаминације у узорцима воде из природне средине. Налаз свих испитиваних вируса, осим хепатитис А вируса, индиректно указује и на присуство и учесталости испитиваних вируса код људи и животиња, што у великој мери доприноси оригиналности ове дисертације. Поред тога, у раду је указано на потенцијалну опасност коју детектовани вируси представљају за здравље људи и животиња. Кандидат је са вирусолошког аспекта указао на значај фекалне контаминације површинских вода, потребу за пречишћавањем отпадних вода пре уливања у реципијенте, као и на важност праћења присуства вируса у површинским водама, у циљу адекватније процене микробиолошког квалитета, који се тренутно процењује само на основу бактериолошких параметара. Овим је кандидаткиња отворила ново поље за истраживање и дала основ за друга слична истраживања. На основу свега изнетог, **дисертација представља оригиналан допринос науци.**

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Комисија оцењује да дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке који би могли утицати на резултате истраживања.
X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
Комисија предлаже да се докторска дисертација под насловом „Присуство и раширеност вируса животиња и људи у површинским водама Војводине“ прихвати и да се кандидату Госпави Лазић одобри одбрана.

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.

У Новом Саду, 15.08.2016. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Весна Милошевић,
редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду,
Институт за јавно здравље Војводине, Нови Сад,
председник комисије

др Михајла Ђан,
ванредни професор, ПМФ Нови Сад, Универзитет у Новом Саду,
члан

Др Сава Лазић,
научни саветник, Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад,
ванредни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,
члан

Др Петар Кнежевић,
ванредни професор, ПМФ Нови Сад, Универзитет у Новом Саду,
ментор

Др Тамаш Петровић,
научни саветник, Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад,
ментор