

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

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

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

10 Наставно – научно Веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у
11 Београду је на својој 174. седници од 18.01.2017.године именовало Комисију за оцену
12 завршене докторске дисертације кандидата др.вет. мед. Радоша Миковића.

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

- 17 1. др Јаков Нишавић, ван. професор, Микробиологија са имунологијом, 2014.година,
18 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
19 2. др Ненад Милић, ред. професор, Микробиологија са имунологијом, 2005.година,
20 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
21 3. др Дејан Крњић, ред.професор, Микробиологија са имунологијом, 2016.година,
22 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
23 4. др Александра Кнежевић, ван.професор, Микробиологија, 2014.година, Медицински
24 факултет Универзитета у Београду

25
26 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

- 27 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Радош Драган Миковић
28 2. **Датум рођења, општина, Република:** 21.11.1985.године, Савски венац, Београд,
29 Република Србија
30 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**
31 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

32
33 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** «Молекуларна детекција и
34 филогенетска анализа вируса Аујецкијеве болести, парвовируса и свињског
35 цирковируса тип 2 код свиња у Црној Гори»

36
37 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља,**
38 **слика, шема, графикона и сл.):**

39 Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Радоша Миковића написана је на
40 укупно 95 страна компјутерски откуцаног текста и садржи следећа поглавља: Увод (9
41 страна), Преглед литературе (29 страна), Циљ и задаци испитивања (1 страна),
42 Материјал и методе рада (11 страна), Резултати испитивања (20 страна), Дискусија (14
43 страна), Закључци (2 стране), Списак литературе (9 страна), Кратак садржај на српском
44 и енглеском језику. Дисертација је документована са 14 слика и 3 табеле.

45
46 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати**
47 **кратак опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и**
48 **задатака истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка**
49 **референци):**

50 У поглављу **Увод** кандидат је приказао основне биолошке карактеристике вируса
51 Аујецкијеве болести, парвовируса свиња и свињског цирковируса тип 2 које су
52 обухватиле опис структуре и грађе наведених вируса као и податке који се односе на
53 отпорност наведених вируса у спољашњој средини. У овом поглављу докторске
54 дисертације кандидат је навео методе лабораторијске дијагностике које се користе у
55 циљу откривања присуства вируса Аујецкијеве болести, парвовируса свиња и свињског

1 цирковируса тип 2 у узорцима материјала пореклом од свиња. Поред овога, кандидат је
2 у уводу докторске дисертације детаљно описао клиничке симптоме обољења и
3 превентивне мере које се примењују у запатима свиња у циљу спречавања инфекција
4 изазваних претходно наведеним вирусима.

5 Поглавље **Преглед литературе** се састоји из три дела. У првом делу су приказани
6 подаци из стране литературе који се односе на основне биолошке карактеристике
7 вируса Аујецкијеве болести. Вирус Аујецкијеве болести, псевдорабијес вирус (PrV) или
8 херпесвирус 1 свиња (SuHV-1) припада роду *Varicellovirus*, подфамилији
9 *Alphaherpesvirinae* и фамилији *Herpesviridae*. Геном вируса чини линеарни дволанчани
10 молекул ДНК, а поседује и спољашњи омотач у чијем саставу се налазе
11 гликопротеински антигени вируса који су кључни за одвијање процеса вирусне
12 инфекције ћелије. До данас су описана четири генотипа вируса Аујецкијеве болести и
13 неколико подтипова вируса. Код европских дивљих свиња установљено је присуство
14 сојева вируса Аујецкијеве болести који припадају генотипу 1 вируса, док је код
15 домаћих свиња на територији Европе утврђено доминантно присуство сојева вируса
16 који припадају генотиповима 1 и 2. Присуство сојева вируса који припадају
17 генотиповима 3 и 4 установљено је на територијама Северне Европе и Азије. У овом
18 делу докторске дисертације кандидат наводи литературне податке који се односе на
19 клиничке симптоме обољења различитих старосних категорија свиња и других врста
20 животиња (пси, преживари) инфицираних вирусом Аујецкијеве болести. У овом делу
21 поглавља Преглед литературе описана је патогенеза ове вирусне инфекције, затим
22 приказани су литературни подаци који се односе на начине преношења вируса у
23 популацији пријемчивих животиња, а наведене су и методе које се користе у
24 лабораторијској дијагностици ове значајне вирусне инфекције.

25 У другом делу овог поглавља описане су основне биолошке карактеристике
26 парвовируса свиња (PPV). Наведени вирус припада роду *Parvovirus*, подфамилији
27 *Parvovirinae* и фамилији *Parvoviridae*. Геном парвовируса свиња састоји се од
28 линеарног једноланчаног молекула ДНК. Не поседује спољашњи омотач. Капсид
29 вируса је икосаедричне симетрије и састављен је од 60 молекула VP2 протеина и
30 неколико молекула протеина VP1. Трећи протеин капсида је VP3. Према до сада
31 доступним литературним подацима још увек не постоји подела парвовируса на
32 генотипове. На основу добијених резултата филогенетске анализе, сојеви парвовируса
33 пореклом од домаћих и дивљих свиња из различитих географских подручја су сврстани
34 у одговарајуће групе/кластере. На основу неких литературних података сојеви
35 парвовируса пореклом од домаћих и дивљих свиња из различитих делова света су, на
36 основу резултата филогенетске анализе VP1 и VP2 гена, сврстани у шест
37 група/кластера (А-Ф), а на основу филогенетске анализе делова секвенци VP1 и VP2
38 гена у осам група/кластера (А-Н). У овом делу поглавља докторске дисертације
39 кандидат је приказао литературне податке који се односе на клиничке симптоме
40 обољења код свиња, патогенезу ове вирусне инфекције као и на који начин се наведени
41 вирус преноси у запатима свиња. Поред овога у овом поглављу су наведене методе које
42 се користе у лабораторијској дијагностици парвовиросе свиња.

43 У трећем делу кандидат је навео основне биолошке карактеристике свињског
44 цирковируса тип 2 (PCV2). Наведени вирус припада роду *Circovirus* и фамилији
45 *Circoviridae*. До данас су описана четири генотипа свињског цирковируса тип 2 и то
46 PCV2a, PCV2b, PCV2c и PCV2d. Геном вируса се састоји од циркуларног,
47 једноланчаног позитивно оријентисаног молекула ДНК. Вируси из фамилије
48 *Circoviridae* не поседују спољашњи омотач, сферичног су облика, а капсид је
49 икосаедричне симетрије. У овом делу поглавља Преглед литературе, наведени су
50 најважнији клинички симптоми обољења који се јављају код свиња (мултисистемски
51 синдром кржљања прасади после залучења, синдром свињског дерматитиса и
52 нефритиса, репродуктивни поремећаји код животиња), затим описана је патогенеза
53 болести изазване наведеним вирусом као и начин преношења ове инфекције у запатима
54 свиња. У овом делу докторске дисертације наведене су методе које се користе у
55 лабораторијској дијагностици цирковирусних инфекција свиња.

1 У поглављу **Циљ и задаци испитивања** кандидат наводи да је циљ ових
2 испитивања да применом технике молекуларне детекције и филогенетском анализом
3 вируса Аујецкијевог болести, парвовируса и свињског цирковируса тип 2 код свиња у
4 Црној Гори утврди њихову припадност одређеним генотиповима (вирус Аујецкијевог
5 болести и свињски цирковирус тип 2), односно одређеној групи/кластеру (парвовирус
6 свиња).

7 У циљу реализације испитивања, постављени су следећи задаци:

8 1. прикупљање узорака (слезине, лимфни чворови, тонзиле, сакралне ганглије) од
9 невакцинисаних свиња различитих старосних категорија са или без клиничких
10 симптома болести, гајених у екстензивним условима држања на територији Републике
11 Црне Горе;

12 2. испитивање наведених узорака применом неких класичних и молекуларних
13 метода вирусолошке дијагностике.

14 3. упоређивање делова генома вируса Аујецкијевог болести, свињског парвовируса и
15 свињског цирковируса тип 2 идентификованих или изолованих код свиња на
16 територији Црне Горе са аналогним секвенцама генома референтних и изолованих
17 сојева претходно наведених вируса из других делова света у циљу утврђивања
18 сличности и разлика између њих.

19 4. филогенетска анализа вируса Аујецкијевог болести, парвовируса свиња и
20 свињског цирковируса типа 2 идентификованих на територији Републике Црне Горе.

21 У поглављу **Материјал и методе испитивања** кандидат је детаљно описао
22 материјал и методе које је користио током израде докторске дисертације. У циљу
23 реализације испитивања прикупљено је осамдесет узорака ткива и органа (слезина,
24 лимфни чворови, плућа) и исто толико узорака сакралних ганглија пореклом од
25 невакцинисаних свиња из екстензивног начина гајења из више региона на територији
26 Црне Горе. Свиње од којих је вршено прикупљање узорака материјала за испитивања
27 су биле различитих старосних категорија са или без клиничких симптома болести.

28 У испитивањима су коришћени сојеви *Ерцеговац* вируса Аујецкијевог болести
29 (Научни институт за ветеринарство Србије у Београду, Србија), *Teen* парвовируса свиња
30 (American Bioresearch, SAD) и *1010-PCV2* свињског цирковируса тип 2 (Научни
31 институт за ветеринарство „Нови Сад“ у Новом Саду, Србија) који су служили као
32 позитивна контрола код извођења ланчане реакције полимеразе (PCR) и изолације
33 вируса у култури ћелија.

34 Екстракција нуклеинских киселина вируса Аујецкијевог болести, свињског
35 парвовируса и свињског цирковируса типа 2 из испитиваних узорака вршена је
36 коришћењем комерцијалног кита (Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification
37 Kit) произвођача Thermo Scientific, SAD.

38 Откривање присуства нуклеинске киселине вируса Аујецкијевог болести у
39 испитиваним узорцима је вршено применом ланчане реакције полимеразе уз
40 коришћење прајмера за део gB гена (forward 5-CCTCGTAGTACACGTACCCG-3 and
41 reverse 5-CTGGTGCGAGCTGCAGAACAAG-3 (произвођача Metabion International,
42 Немачка). Присуство нуклеинске киселине свињског парвовируса (PPV) и цирковируса
43 свиња тип 2 (PCV2) у испитиваним узорцима вршено је применом методе ланчане
44 реакције полимеразе уз коришћење прајмера за део VP2 гена вируса PPV (forward 5-
45 CACAGAAGCAACAGCAATTAGG-3 и reverse 5-CTAGCTCTGTGAAGATGTGG-3-
46 (произвођача Metabion International, Немачка), односно прајмера за део ORF1 региона
47 генома вируса PCV2 (forward 5-CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT-3 и reverse 5-
48 TCG ATCAGACAGTCTCAGTAG- 3, произвођача Metabion International, Немачка).

49 За извођење методе PCR је поред претходно наведених прајмера коришћен и Dream
50 Taq PCR Master Mix (произвођача Thermo Scientific, SAD).

51 За изолацију и идентификацију вируса Аујецкијевог болести, свињског парвовируса
52 и свињског цирковируса типа 2 из испитиваних узорака у којима је претходно применом
53 методе PCR утврђено присуство нуклеинске киселине, коришћене су две ћелијске
54 линије PK-15 и SK-6 (IZSBS, Бреша, Италија).

1 Секвенцирање делова генома вируса Аујецкијеве болести, свињског парвовируса и
2 свињског цирковируса тип 2, применом методе директног секвенцирања делова генома
3 по Сангер-у вршено је уз коришћење ABI BigDye Terminator v.3.1 кита (Applied
4 Biosystem, Foster City, SAD).

5 Поступак екстракције нуклеинских киселина вируса Аујецкијеве болести,
6 парвовируса свиња и свињског цирковируса тип 2 из испитиваних узорака извођен је уз
7 коришћење комерцијалног кита за екстракцију вирусне ДНК Thermo Scientific GeneJet
8 Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD) по упутству произвођача.

9 Протокол за извођење ланчане реакције полимеразе за откривање присуства
10 нуклеинске киселине вируса Аујецкијеве болести обухватао је примарну денатурацију
11 на температури од 95°C током временског периода од 4 минута, затим 40 циклуса
12 денатурације на температури од 95°C током 30 секунди, везивања прајмера на
13 температури од 58°C за 30 секунди и продужавања ланца на температури од 72°C у
14 временском периоду од 1 минут и на крају финалну елонгацију на температури од 72°C
15 у трајању од 10 минута. Протокол за извођење ланчане реакције полимеразе за
16 откривање присуства нуклеинске киселине парвовируса свиња је обухватао примарну
17 денатурацију на температури од 95°C током временског периода од 4 минута, затим 36
18 циклуса денатурације на температури од 95°C током 30 секунди, везивања прајмера на
19 температури од 55°C за 30 секунди и продужавања ланца на температури од 72°C у
20 временском периоду од 1 минуте и на крају финалну елонгацију на температури од
21 72°C у трајању од 10 минута. Протокол за извођење ланчане реакције полимеразе за
22 откривање присуства свињског цирковируса типа 2 је обухватао примарну
23 денатурацију на температури од 95°C током временског периода од 4 минута, затим 35
24 циклуса денатурације на температури од 95°C током 30 секунди, везивања прајмера на
25 температури од 56°C за 30 секунди и продужавања ланца на температури од 72°C у
26 временском периоду од 1 минута и на крају финалну елонгацију на температури од
27 72°C у трајању од 10 минута. Резултати извођења методе ланчане реакције полимеразе
28 су читавани после извођења хоризонталне гел електрофорезе. Присуство ДНК
29 фрагмента величине од 368 bp за вирус Аујецкијеве болести, 203 bp за парвовирус
30 свиња, односно 703bp за свињски цирковирус тип 2 у гелу агарозе, сматрано је
31 позитивним налазом.

32 Узорци материјала пореклом од свиња у којима је претходно методом ланчане
33 реакције полимеразе утврђено присуство нуклеинских киселина вируса Аујецкијеве
34 болести, парвовируса свиња и свињског цирковируса тип 2 су појединачно
35 инокулисани у ћелијске линије PK-15 и SK-6 које су, свака линија посебно, претходно
36 биле узгајане у микротитрационим плочама са по 24 удубљења. У сва удубљења
37 микротитрационих плоча са ћелијским линијама је појединачно сипано по 100µl
38 узорака. Микротитрационе плоче са узорцима су затим инкубисане на температури од
39 37° С у трајању од 1 час у атмосфери која је била засићена са 5% CO₂. По истеку
40 наведеног временског периода, у сва удубљења микротитрационих плоча је
41 појединачно додато по 500µl хранљиве подлоге Eagle-MEM са 2% феталног телећег
42 серума (РАА, Аустрија). Овако припремљене микротитрационе плоче са узорцима су
43 затим стављене у термостат на температуру од 37°C и свакодневно опсервиране на
44 појаву цитопатогеног ефекта (CPE) током седам дана.

45 Откривање присуства вируса Аујецкијеве болести у инокулисаним ћелијским
46 линијама је вршено применом теста вирус-неутрализације, свињског парвовируса
47 применом тестова хемаглутинације и инхибиције хемаглутинације по стандардној
48 процедури извођења, док је присуство свињског цирковируса тип 2 у инокулисаним
49 ћелијским линијама доказивано применом методе ланчане реакције полимеразе по
50 претходно описаном протоколу извођења, коме је претходила екстракција вирусне
51 нуклеинске киселине из ћелија по процедури прописаној од стране произвођача
52 комерцијалног кита за екстракцију вирусне ДНК Thermo Scientific GeneJet Genomic
53 DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD).

54 Секвенцирање делова генома идентификованих вируса Аујецкијеве болести,
55 свињског парвовируса и свињског цирковируса тип 2 је извршено применом методе

1 директног секвенцирања по Сангер-у. Пре извођења наведене методе вршено је
2 пречишћавање добијених PCR продуката применом комерцијалног кита за
3 пречишћавање QIA quick PCR Purification Kit“ произвођача „Qiagen“, SAD, по упутству
4 произвођача.

5 Пречишћени PCR продукти су затим коришћени за припремање мешавине за
6 извођење реакције секвенцирања (cycle sequencing) уз примену реагенса
7 комерцијалног кита ABI BigDye Terminator v.3.1 кита (Applied Biosystem, Foster City,
8 SAD). Мешавина је по једном узорку садржавала следеће: 2 µl Dye Mix, 2 µl Dye buffer,
9 прајмер F forward 1,2 µl, воде 1,8 µl и 3 µl пречишћеног PCR продукта. Иста таква
10 мешавина је истовремено припремана за сваки узорак посебно, с тим што је уместо
11 „forward“ прајмера, садржавала „reverse“ прајмер.

12 Реакција секвенцирања је извођена по следећем протоколу: 30 циклуса
13 денатурације на температури од 96°C у трајању од 10 секунди, везивања прајмера на
14 50°C током 5 секунди и елонгације на температури од 60°C у временском периоду од 4
15 минута.

16 После завршетка извођења реакције секвенцирања, добијени производ је третиран у
17 циљу накнадног пречишћавања са 75% изопропанолом на следећи начин:

- 18 1. У микротубе са продуктима секвенцирања је појединачно додато 80 µl 75%
19 изопропанола. Овако припремљени узорци су затим инкубисани у временском
20 периоду од 15 минута.
- 21 2. Микротубе су затим центрифугиране на 2000 о/мин у трајању од 45 минута.
- 22 3. Микротубе са узорцима су затим осушене центрифуговањем на 700о/мин у
23 трајању од 2 минута, а потом додатно осушене на собној температури.
- 24 4. После овога је у све микротубе појединачно додато по 10 µl формамида у циљу
25 денатурације молекула ДНК. На овај начи су припремљени узорци за извођење
26 методе директног секвенцирања по Сангер-у у секвенционеру ABI Prism 310
27 Genetic Analyzer.

28 Применом методе директног секвенцирања вршено је одређивање редоследа
29 нуклеотида дела gB гена вируса Аујецкијеве болести, затим VP2 гена свињског
30 парвовируса, односно дела ORF1 региона генома цирковируса свиња тип 2. По
31 завршеном извођењу поступка директног секвенцирања по Сангер-у, нуклеотидне
32 секвенце наведених вируса идентификованих код свиња пореклом са територије Црне
33 Горе су, применом одговарајућег компјутерског софтвера, упоређиване са познатим
34 секвенцама наведених сојева вируса које се налазе у генској бази података у циљу
35 утврђивања сличности или разлика између њих (Gene Bank database using BLAST tool
36 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)).

37 Филогенетска анализа, извршена применом компјутерског програма МЕГА 6,
38 омогућила је утврђивање сличности или разлика између делова нуклеотидних секвенци
39 вируса Аујецкијеве болести, парвовируса свиња и свињског цирковируса тип 2
40 идентификованих код свиња на територији Републике Црне Горе са секвенцама
41 референтних сојева, односно изолованих сојева наведених вируса који се налазе
42 објављене у генској бази података.

43 У поглављу **Резултати испитивања** кандидат је прегледно и детаљно представио
44 резултате својих испитивања. Применом методе PCR уз коришћење прајмера за
45 гликопротеин В (gB), присуство вируса Аујецкијеве болести утврђено је код три
46 испитивана узорка. Присуство нуклеинске киселине наведеног вируса је установљено у
47 три узорка испитиваног материјала (један узорак лимфног чвора и два узорка
48 сакралних ганглија) пореклом од три различите свиње. У односу на укупан број
49 испитаних узорака, број позитивних узорака изражен у процентима је износио 1,8%.

50 Прикупљени узорци материјала пореклом од свиња испитивани су и на присуство
51 нуклеинске киселине свињског парвовируса применом методе PCR уз коришћење
52 прајмера за део VP2 гена. Присуство нуклеинске киселине наведеног вируса утврђено
53 је код 10, односно 12,5% збирних узорака органа свиња. Појединачним испитивањем
54 збирних узорака, присуство вируса је установљено код осам узорака лимфних чворова
55 и два узорка слезина пореклом од различитих свиња.

1 Збирни узорци свиња, претходно испитани на присуство вируса Аујецкијеве
2 болести и свињског парвовируса, испитани су на присуство нуклеинске киселине
3 свињског цирковируса тип 2 применом методе PCR уз коришћење прајмера за део
4 ORF1 региона генома наведеног вируса. Код девет збирних узорака испитиваног
5 материјала установљено је присуство нуклеинске киселине свињског цирковируса тип
6 2. Појединачним испитивањем узорака материјала, утврђено је присуство вируса PCV2
7 код седам узорака лимфних чворова и два узорка слезине пореклом од различитих
8 свиња. Број позитивних збирних узорака изражен у процентима износио је 11,2%.

9 Мешовита инфекција изазвана вирусом Аујецкијеве болести и свињским
10 парвовирусом утврђена је у једном испитаном узорку лимфног чвора свиња. Присуство
11 свињског парвовируса и свињског цирковируса типа 2 је установљено код три збирна
12 узорка лимфних чворова свиња.

13 После појединачне инокулације узорака материјала пореклом од свиња у ћелијске
14 линије PK-15 и SK-6, није извршена изолација вируса Аујецкијеве болести и свињског
15 парвовируса.

16 После инокулације узорака материјала пореклом од свиња позитивних на присуство
17 нуклеинске киселине свињског цирковируса тип 2 у ћелијске линије, применом методе
18 PCR уз коришћење прајмера за део ORF1 региона генома наведеног вируса
19 установљено је умножавање вируса у једној ћелијској линији. С обзиром да свињски
20 цирковирус тип 2 у инокулисаним ћелијским линијама не доводи до појаве
21 цитопатогеног ефекта, његово умножавање се може установити применом методе PCR.

22 Резултати испитивања су показали да је редослед секвенци нуклеотида дела gB гена
23 код сва три идентификована вируса пореклом од свиња са територије Црне Горе био
24 идентичан (100% сличности између делова аналогних нуклеотидних секвенци).
25 Нуклеотидне секвенце дела gB гена три вируса Аујецкијеве болести идентификована у
26 узорцима свиња пореклом са територије Црне Горе имале су 100% сличности са
27 аналогним секвенцама сојева Kaplan (JF797218.1) и Bartha (JF797217.1) пореклом из
28 Мађарске, затим сојева Kolchis (KT983811.1) и Hercules (KT983810.1) пореклом из
29 Грчке, односно са нуклеотидним секвенцама сојева NIA3 (KU900059.1) пореклом из
30 Велике Британије и Becker (JF797219.1) пореклом из САД. Нуклеотидне секвенце три
31 идентификована вируса Аујецкијеве болести имале су нижи степен сличности (99%) са
32 аналогним секвенцама сојева HeN1 (KP098534.1), HNZZ-China – 2012 (KJ526433.1), JS-
33 2012 (KP257591.1) и HNQX-China-2012 (KJ526437.1) пореклом из Кине. Најнижи
34 степен сличности (98%) нуклеотидне секвенце три идентификована вируса Аујецкијеве
35 болести имале су са аналогним секвенцама нуклеотида дела gB гена сојава Ea
36 (KU315430.1), Fa (KM89913.1), SC (KT809429.1) и GD-SH (KT948054.1)
37 идентификованих код свиња на територији Кине.

38 На филогенетском стаблу су три вируса Аујецкијеве болести идентификована код
39 свиња са територије Црне Горе груписана заједно са сојевима Kaplan (JF797218.1) и
40 Bartha (JF797217.1) вируса пореклом из Мађарске, односно сојевима Kolchis
41 (KT983811.1) пореклом из Грчке и Becker (JF797219.1) пореклом из САД. Као што је
42 напред напоменуто, нуклеотидне секвенце дела gB гена три вируса Аујецкијеве
43 болести идентификоване код свиња у Црној Гори имале су нижи степен сличности са
44 сојевима HeN1 (KP098534.1), HNQX-China-2012 (KJ526437.1), JS 2012 (KP257591.1),
45 HNZZ-China – 2012 (KJ526433.1) и TJ (KJ789182.1) пореклом из Кине који су из тог
46 разлога одвојено груписани на филогенетском стаблу. На основу резултата извршене
47 филогенетске анализе вируси Аујецкијеве болести идентификовани код свиња у Црној
48 Гори сврстани су у генотип 1.

49 Резултати испитивања су показали да су нуклеотидне секвенце дела VP2 гена пет
50 одабраних парвовируса свиња идентификованих код свиња у Црној Гори испољиле
51 сличност од 100%. Овде треба напоменути да је пет одабраних свињских парвовируса
52 за извођење методе директног секвенцирања било идентификовано у узорцима
53 испитиваног материјала свиња са територије Црне Горе. Нуклеотидне секвенце пет
54 свињских парвовируса биле су идентичне (100% сличности) са аналогним секвенцама
55 соја Challenge (KF049426.1) пореклом из Велике Британије, затим сојева свињског

1 парвовируса 77 (KP245936.1) и LZ (HM627653.1) пореклом из Кине и сојем Kresse
2 (U44978.1) пореклом из САД. На основу добијених резултата испитивања вируси
3 идентификовани код свиња са територије Црне Горе су заједно са наведеним сојевима
4 вируса из других делова света на филогентском стаблу груписани заједно у једну
5 монофилетску групу. Нуклеотидне секвенце сојева NADL-2 (NC001718.1) пореклом из
6 САД и VRI-1 (AY390557.1) пореклом из Јужне Кореје су имале 99% сличности са
7 аналогним нуклеотидним секвенцама свињских парвовируса идентификованих код
8 свиња у Црној Гори. Из наведеног разлога сојеви свињског парвовируса пореклом из
9 САД и Јужне Кореје су груписани одвојено у посебну грану филогенетског стабла.

10 На основу резултата филогенетске анализе редоследа нуклеотида дела VP2 гена
11 идентификованих свињских парвовируса и аналогних секвенци наведеног гена других
12 сојева поменутог вируса објављених у генској бази података, извршено је груписање
13 одабраних вируса пореклом од свиња из Црне Горе у одговарајуће кластере, односно
14 групе. На основу резултата филогенетске анализе вируси идентификовани из узорак
15 свиња са територије Црне Горе сврстани су заједно са сојевима свињског парвовируса
16 77 (KP245936.1) пореклом из Кине, затим са сојевима S31 VP1/VP2 (FJ643431.1), S30
17 VP1/VP2 (FJ6463430.1), 32-96 (AY145472.1) и 142-94 (AY145474.1) пореклом са
18 територије Бразила, односно са сојевима Challenge (KF049426.1) пореклом из Велике
19 Британије и сојем Kresse (U44978.1) пореклом из САД и припадају кластеру Е
20 парвовируса свиња.

21 За извођење методе директног секвенцирања по Сангер-у и филогенетске анализе
22 одабрано је шест свињских цирковируса типа 2 идентификованих код свиња у Црној
23 Гори. Резултати испитивања су показали да су нуклеотидне секвенце дела ORF1
24 региона генома пет свињских цирковируса тип 2 идентификованих код свиња у Црној
25 Гори биле идентичне са аналогним нуклеотидним секвенцама сојева Treviso
26 (KP231172.1) изолованим код свиња у Италији, NIVS 3 (HQ378160.1) и NIVS 5
27 (HQ378159.1) идентификованим код свиња у Србији, затим сојевима Aust3959
28 (EU886637.1), AUT4 (AY424404.1) и AUT5 (AY424405.1) пореклом из Аустрије,
29 односно сојевима YJ (HM038032.1) и Xt2008 (KM624032.1) пореклом са територије
30 Кине и да су на филогенетском стаблу сви претходно наведени сојеви вируса груписани
31 заједно. На основу филогенетске анализе нуклеотидних секвенци дела ORF1 региона
32 генома вируса PCV2 идентификованих код свиња са територије Црне Горе и аналогних
33 секвенци нуклеотида сојева наведеног вируса из других делова света, установљено је да
34 пет идентификованих вируса пореклом из Црне Горе припадају генотипу PCV2b.

35 Добијени резултати испитивања су показали да је нуклеотидна секвенца дела ORF1
36 региона генома једног свињског цирковируса тип 2 идентификованог из узорак свиња
37 пореклом са територије Црне Горе била идентична са аналогним секвенцама сојева
38 Mantova (KP231140.1) изолованим код свиња у Италији, затим сојевима DE222-13
39 (KP698398.1) пореклом из Немачке и JVNAN (KP313254.1) идентификованим код
40 свиња у Кини. Резултати филогенетске анализе су показали да су један свињски
41 цирковирус тип 2 идентификован код свиња на територији Црне Горе и претходно
42 наведени сојеви вируса груписани заједно на филогенетском стаблу и да припадају
43 генотипу PCV2c вируса.

44 У поглављу **Дискусија** кандидат је добијене резултате својих испитивања
45 упоредио са резултатима сличних испитивања страних аутора.

46 У поглављу **Списак литературе** кандидат је навео списак од 74 коришћене
47 референце.

48 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у** 49 **докторској дисертацији):**

50 На основу добијених резултата испитивања изведени су следећи закључци:

- 51 1. Применом методе ланчане реакције полимеразе утврђено је присуство
52 нуклеинске киселине вируса Аујецкијеве болести у три испитивана узорка,
53 свињског парвовируса у 10 узорак и свињског цирковируса тип 2 у 9 узорак.

2. На ћелијским линијама PK15 и SK-6 нису изоловани вирус Аујецкијеве болести и свињски парвовирус, док је умножавање једног свињског цирковируса тип 2 у ћелијској линији PK-15 установљено применом методе PCR.
3. Мешовита инфекција свиња изазвана вирусом Аујецкијеве болести и свињским парвовирусом утврђена је код једне свиње, а парвовирусом свиња и свињским цирковирусом тип 2 код три животиње.
4. Нуклеотидне секвенце три вируса Аујецкијеве болести биле су идентичне аналогним секвенцама нуклеотида сојева вируса пореклом из Мађарске, Грчке и САД. Филогенетска анализа уз примену Neighbor-joining, Maximum likelihood и Maximum parsimony метода је показала да сва три вируса идентификована код свиња на територији Црне Горе припадају генотипу 1.
5. Нуклеотидне секвенце пет одабраних свињских парвовируса идентификованих код свиња у Црној Гори биле су идентичне са аналогним секвенцама сојева вируса пореклом из Велике Британије, Кине, Бразила и САД.
6. Филогенетском анализом уз примену Neighbor-joining, Maximum likelihood и Maximum parsimony метода је утврђено да идентификовани парвовируси свиња пореклом из Црне Горе и сојеви вируса пореклом из Велике Британије, Кине, Бразила и САД припадају истој монофилетској групи, односно да припадају кластеру E наведеног вируса.
7. Нуклеотидне секвенце пет свињских цирковируса тип 2 идентификованих код свиња у Црној Гори биле су идентичне аналогним секвенцама сојева вируса пореклом из Италије, Србије, Аустрије и Кине, док је нуклеотидна секвенца једног идентификованог вируса код свиња у Црној Гори била идентична са секвенцама сојевима вируса PCV2 пореклом из Италије, Немачке и Кине.
8. Филогенетском анализом уз примену Neighbor-joining, Maximum likelihood и Maximum parsimony метода утврђено је да пет вируса PCV2 идентификованих код свиња у Црној Гори припада генотипу PCV2b, односно да један идентификовани вирус припада генотипу PCV2c.

VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА

ИСТРАЖИВАЊА (навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):

Комисија сматра да су добијени резултати испитивања у складу са постављеним циљем и задацима истраживања и да закључци ове докторске дисертације произилазе из добијених резултата.

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Радоша Миковића је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

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

Докторска дисертација кандидата др.вет.мед. Радоша Миковића садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Испитивања која су била предмет ове докторске дисертације имала су за циљ молекуларну детекцију и филогенетску анализу вируса Аујецкијеве болести, свињског парвовируса и свињског цирковируса тип 2 код свиња на територији Црне Горе. Резултати испитивања приказани у оквиру ове докторске дисертације пружају податке о присуству и молекуларним карактеристикама генома наведених вируса идентификованих код свиња на подручју Црне Горе који до сада нису били доступни научној јавности. Делови нуклеотидних секвенци идентификованих вируса утврђени применом молекуларних метода, упоређивани су са аналогним нуклеотидним секвенцама сојева вируса Аујецкијеве болести, свињског парвовируса и свињског

1 цирковируса тип 2 изолованих широм света у циљу утврђивања сличности и разлика
2 између њих. На овај начин остварен је увид у степен подударности између
3 нуклеотидних секвенци претходно наведених вируса идентификованих код свиња у
4 Црној Гори и сојева вируса изолованих у другим деловима света.

5
6 **IX ПРЕДЛОГ:**

7 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
8 **три понуђених могућности):**

9 На основу укупне оцене докторске дисертације др. вет. мед. Радоша Миковића,
10 комисија предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

11
12
13
14
15
16
17 ДАТУМ
18 КОМИСИЈЕ
19 06.03.2017.године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА

20
21 _____
22 Др Јаков Нишавић, ван.проф.
23 Факултет ветеринарске медицине
24 Универзитета у Београду

25
26 _____
27 Др Ненад Милић, ред.проф.
28 Факултет ветеринарске медицине
29 Универзитета у Београду

30
31 _____
32 Др Дејан Крњаић, ван.проф.
33 Факултета ветеринарске медицине
34 Универзитета у Београду

35
36 _____
37 Др Александра Кнежевић, ван.проф.
38 Медицинског факултета
Универзитета у Београду