

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА Пољопривредни факултет

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију 27.05.2011; Наставно-научно веће Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду.</p> <p>2. Састав комисије са знаком 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:</p> <p>1. др Бранислав Лако, редовни професор, Микробиологија и заразне болести животиња, Датум избора: 04.11. 2009. година; Пољопривредни факултет Нови Сад</p> <p>2. др Сава Лазић, научни саветник, Микробиологија и заразне болести животиња, Датум избора: 07.10. 2004. година, Научни институт за ветеринарство "Нови Сад"</p> <p>3. др Славица Кнежевић-Ушај, ванредни професор, Патологија, Датум избора: 26.06.2011. година; Медицински факултет Нови Сад</p> <p>4. др. Младен Гагрчин, редовни професор, Болести животиња и хигијена анималних производа, Датум избора: 22.09.2006 година; Пољопривредни факултет Нови Сад</p> <p>5. др Тамаш Петровић, виши научни сарадник, Микробиологија и заразне болести животиња, Датум избора: 02.11.2011. година, Научни институт за ветеринарство "Нови Сад"</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Диана, Миливоја, Лупуловић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 12.03.1971; Зрењанин; Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду; "Испитивање хуморалног имунолошког одговора крмача после вакцинације инаквивисаним вакцинама против</p>

парвовиروزе свиња и перзистенције специфичних матерналних антитела код њихове прасади"; научна област: Микробиологија и заразне болести животиња; датум одбране: 18.04.2007

4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Микробиологија и заразне болести животиња; Ветеринарска медицина

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Развој и примена различитих лабораторијских метода за дијагностиковање инфекције изазване хепатитис Е вирусом код свиња и људи

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл. Докторска дисертација је написана на 162 стране текста, са 8 поглавља (Увод, Преглед литературе, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци, Литература.), садржи 25 табела, 6 графикана, 26 слика и 246 библиографских јединица из стране и домаће литературе. На почетку дисертације налази се садржај и кратак садржај на српском и енглеском језику са кључним речима (15 страна).

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Увод- у уводу дисертације кандидат на сажет и експлицитан начин износи релевантне податке о значају инфекције изазване хепатитис Е вирусом код људи и животиња. Истакнуте су чињенице да овом истраживању у нашој земљи до сада није посвећена довољна пажња, тако да постоји потреба за контролом болести и дефинисањем протокола за лабораторијско испитивање узорака, како код свиња на фармама и код људи, тако и у узорцима меса и јетри свиња у кланицама.

Преглед литературе - кандидат износи савремене литературне податке, домаћих и страних аутора, који обухватају научне чињенице о HEV инфекцији код људи, свиња и осталих животињских врста. Преглед литературе је подељен у 9 целина (Историјат, Етиологија, Епидемиологија, Трансмисија HEV, Патогенеза и имунолошки одговор, Клиничка слика, Патоморфолошке промене, Дијагностичке методе, Терапија и профилакса).

Циљеви истраживања су јасно дефинисани и односе се на:

1. Серолошко испитивање присуства и раширености инфекције изазване хепатитис Е вирусом код свиња на фармама са индустријским начином узгоја и код људи у Јужнобачком и Сремском округу,
2. Утврђивање присуства генома хепатитис Е вируса у фецесу, месу, жучи и јетри прасади и свиња на линији клања,
3. Развој и увођење савремених лабораторијских дијагностичких метода: некомерцијални ЕЛИСА теста (*in-house* ELISA), комерцијални ЕЛИСА тест, Western blot метода, real-time RT-PCR и имунохистохемијска метода за детекцију HEV антигена,
4. Поређење осетљивости и специфичности лабораторијских метода *in house* и комерцијалне ЕЛИСА технике
5. Дефинисање протокола лабораторијског испитивања,

6. Утврђивање постојања епидемиолошке повезаности између инфекција код свиња и људи са истог подручја и утврдити епидемиолошки значај могућности инфицирања људи конзумирањем јетри и меса инфицираних свиња,
7. Статистичка обрада података резултата истраживања

У поглављу **Материјал и методе** детаљно је описан број узорака, начин узорковања, врста узорка, место узорковања, лабораторијске методе као и статистичка обрада података које су коришћене у изради докторске дисертације. Лабораторијска истраживања спроведена су у лабораторији за вирусологију Научног института за ветеринарство „Нови Сад“ и у лабораторији за биохемију Биолошког факултета у Новом Саду. Материјал за истраживање представљао је 300 крви свиња, по 100 узорака са 3 фарме. Са сваке фарме крв је сакупљана од по 20 животиња из 5 различитих производних категорија: одгој, предтов, назимице, крмаче и товљеници. Све одабране огледне животиње припадале су раси шведски Ландрас и биле су клинички здраве. Узорци крви људи сакупљани су у сарадњи са „Заводом за трансфузију крви Војводине“ и „Заводом за јавно здравље Војводине“. Укупно је сакупљено 200 узорака добровољних давалаца крви са територије Јужнобачког и Сремског округа. Током 2010. године прикупљена су и 94 узорка крви пацијената оболелих од хепатитиса и ризичних група трудница (53 труднице и 41 пацијент Инфективне клинике). Узорци фецеса и ткива јетре, жучи и меса сакупљани су у кланицама, директно на линији клања. Узорковање је вршено у четири кланице, на локалитету Новог Сада и околине, у периоду од јануара до маја 2012 године. Две кланице су биле великог капацитета (индустријске кланице), а две мањег капацитета (занатске кланице). Узорци фецеса и ткива сакупљени су од 95 товљеника, узраста 6 месеци и тежине око 100 кг и 50 прасади, узраста од око 2 месеца и тежине око 20 кг. Товљеници су били пореклом са 3 фарме на којима је вршено и узорковање крви за потребе серолошких истраживања, а прасад пореклом од индивидуалних произвођача. Примењене су следеће методе: некомерцијални имуноензимски тест за доказивање специфичних антитела против хепатитис Е вируса код свиња и људи; комерцијални имуноензимски тест за доказивање специфичних антитела против хепатитис Е вируса код свиња и људи, Western blot тест за доказивање специфичних антитела, молекуларна техника real-time RT-PCR за утврђивање генома HEV у узорцима ткива и фецеса свиња, патохистолошко и имунохистохемијско испитивање за детекцију антигена HEV.

Резултати испитивања су приказани јасно, разумљиво и прегледно, по истом редоследу и како је наведено у одељку Материјал и методе. Изнети резултати приказани су текстуално, табеларно, графички и сликама. Најпре су изложени резултати HEV серопреваленције на фармама. *In house* ЕЛИСА тестом на фарми А је доказана серопреваленција од 37%, на фарми Б 31% и на фарми Ц 54%. Исти узорци испитани су и комерцијалним ЕЛИСА тестом и утврђена серопреваленција је износила 40% на фарми А, 41% на фарми Б и 65% на фарми Ц. У укупном броју узорака на свим фармама (300 узорака), применом *in house* ЕЛИСА теста установљена просечна вредност нивоа антитела против HEV износила је 40,66%, а комерцијалним ЕЛИСА тестом 48,66%. Испитани су и узорци крви добровољних давалаца и пацијената са оба ЕЛИСА теста. *In house* ЕЛИСА тестом серопреваленција код добровољних давалаца крви износила је 15%, док су узорци трудница и пацијената били серонегативни. Комерцијалним ЕЛИСА тестом код пацијената и трудница утврђена је серопреваленција од 2,12%. Комерцијалним ЕЛИСА

тестом је прегледан одређен број узорака крви добровољних давалаца (који су дали позитивну и сумњиву реакцију у *in house* ЕЛИСА тесту, као и одређени број серонегативних узорака). Позитиван серолошки резултат је доказан код 17,86% узорака. Western blot техника примењена је ради крајњег дефинисања резултата са сумњивим налазом чије су OD вредности у *in house* ЕЛИСА тесту биле близу *cut off* вредности. Од прегледаних 11 суспектних узорака серума свиња, позитиван налаз потврђен је код 6 узорака, односно прегледом 11 узорака крви људи позитиван серолошки налаз је установљен код 7 узорака. Применом real-time RT-PCR методе, присуство HEV генома доказано је фецесу (54%), жучи (26%), јетри (16%) и месу (10%) прасади на кланицама. У категорији товљеника, HEV RNK је доказана само у фецесу (7,27%). Патохистолошким прегледом 26 узорака јетре прасади са позитивним RT-PCR налазом, код 3 узорка (11,53%) су описане микроскопске промене које одговарају неспецифичном хепатитису са лезијама II степена, док имунохистохемијском анализом није доказано присуство антигена хепатитис Е вируса.

У **Дискусији** кандидат на систематичан и јасан начин образлаже добијене резултате и пореди резултате истраживања са резултатима других домаћих и страних аутора. Цитирани литературни подаци су савременени и представљени на систематичан и разумљив начин. Аутор ове дисертације је у дискусији истакао допринос резултата својих истраживања и критички их анализирао. Кандидат је предложио дијагностички протокол испитивања HEV инфекције код животиња и људи.

Закључци- у овом поглављу кандидат износи закључке својих испитивања који су проистекли из постављених циљева.

Литература- представља списак одабраних референци домаћих и страних аутора. Сви одабрани наводи су релевантни и компетентни.

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

1. Lupulović D., Lazić S., Prodanov-Radulović J., Jimenez de Oya N., Escribano-Romero E., Saiz J., Petrović T.: First Serological Study of Hepatitis E Virus Infection in Backyard Pigs from Serbia. Food Environment Virology, 2, str.110-113, 2010 (eng), M23 3,0
2. Petrović T., Lupulović D., Vojvodić S., Jimenez de Oya N., Escribano-Romero E., Blazquez A., Lazić S., Saiz J.: Seroprevalence of hepatitis E among blood donors in Serbia = Seroprevalenca hepatitisa E kod dobrovoljnih davalaca krvi u Srbiji. Proceedings, Second International epizootiology Symposium [i]XIV Serbian epizootiology days, April 18-21, 2012, Belgrade, glavni i odgovorni urednik Tamaš Petrović, Beograd, SVD, Sekcija za zoonoze, 2012, Str.60-68, ISBN 978-86-83115-20-4 (eng), M33 1,0
3. Petrović T., Lupulović D., Vidanović D., Lazić S.: Detection and characterisation of hepatitis E virus in big industrial pig farms in Serbia. Program and Abstract Book, Future Challenges in Food and Environmental Virology, 2nd COST 929 Symposium 7th-9th

October 2010, Istanbul, Istanbul, COST, 2010, str.43 (eng), M34 0,5

4. Petrović T., Lupulović D., Lazić S., Lazić G., Jimenez de Oya N., Blazquez A., Escribano-Romero E., Saiz J.: Presence of hepatitis E virus infection in wild boar population (*Sus scrofa*) in Serbia. Final Program and Abstract Book, IX International congress of veterinary virology and joint meeting with the European Society of Clinical Virology, 4-7 September 2012, Madrid, [ed. JM Sanchez-Vizcaino], Madrid, University Complutense of Madrid, Veterinary Faculty, 2012, Str.241 (eng), M34 0,5
5. Lupulović D., Lazić S., Jimenez de Oya N., Blazquez A., Escribano-Romero E., Saiz J., Petrović T.: Serological study of hepatitis E virus infection in farming pigs in Serbia. Final Program and Abstract Book, IX International congress of veterinary virology and joint meeting with the European Society of Clinical Virology, 4-7 September 2012, Madrid, [ed. JM Sanchez-Vizcaino], Madrid, University Complutense of Madrid, Veterinary Faculty, 2012, Str.243-244 (eng), M34 0,5
6. Lupulović D., Petrović T., Prodanov-Radulović J., Došen R., Pušić I.: Seroprevalenca hepatitis E virusne infekcije kod divljih svinja u Srbiji = The seroprevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Serbia. Arhiv veterinarske medicine, ISSN 1820-9955, 4, 1, Str.19-29, 2011 (srp), M53 1,0
7. Petrović T., Lupulović D., Prodanov-Radulović J., Došen R., Vidanović D., Lazić S.: Prisustvo hepatitis E virusa (HEV) u farmskom odgoju svinja u Vojvodini i njihova karakterizacija = Presence of hepatitis E virus (HEV) in farm raising pigs in Vojvodina and their characterization. Zbornik referata i kratkih sadržaja, 21. Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor 15-18. septembar 2010. godine, sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srpsko veterinarsko društvo, 2010, Str.136-137, ISBN 978-86-83115-17-4 (srp), M64 0,2

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу резултата истраживања изведени су следећи закључци:

1. Применом серолошких тестова - некомерцијални (*in house*) и комерцијални ЕЛИСА тест доказана су специфична антитела против антигена хепатитис Е вируса код свиња на све три испитујуће фарме на територији Јужне Бачке и Срема.
2. Утврђена серопреваленција *in house* ЕЛИСА тестом на фарми А је износила 37%, на фарми Б 31% и на фарми Ц 54%. Број серопозитивних животиња по узгојним категоријама се кретао од 0 до 85%. Комерцијалним ЕЛИСА тестом установљена је серопреваленција од 40% на фарми А, на фарми Б 41% и на фарми Ц 65%, а број серопозитивних животиња по узгојним категоријама се кретао од 0 до 100%.
3. Упоредном анализом присуства специфичних антитела против HEV у узорцима на све три фарме, *in house* ЕЛИСА методом установљена је просечна серопреваленција од 40,66%, а комерцијалним ЕЛИСА тестом 48,66%.
4. Статистичком анализом применом *Карра* теста, поређењем *in house* и комерцијалног ЕЛИСА теста за крвне серуме свиња израчуната је вредност $\kappa = 0,771$, што представља скоро идеално подударане поређених тестова.

5. Установљена серопреваленција код добровољних давалаца крви *in house* ЕЛИСА тестом износила је 15%. Серопреваленција је расла са старашћу, а није установљена статистички значајна разлика у односу на пол испитаника, место становања или занимање. Испитани узорци трудница и пацијената су били серонегативни.
6. Статистичком анализом применом *Kappa* теста, поређењем *in house* и комерцијалног ЕЛИСА теста за одабране узорке крвних серума добровољних давалаца крви на основу резултата *in house* ЕЛИСА теста, као и пацијената и трудница, израчуната је вредност $\kappa=0,354$, што представља средњи ниво подудараности поређених тестова.
7. Western blot анализом позитиван налаз је установљен код 6 од укупно 11 прегледаних узорака крвних серума свиња са ОД вредностима близу *cut off* вредности у *in house* ЕЛИСА тесту. Од укупно 11 прегледаних узорака крвних серума људи, позитиван налаз је потврђен код 7 узорака.
8. Применом *real-time RT-PCR* методе, HEV RNK је детектована у фецесу (54%), жучи (26%), јетри (16%) и месу (10%) прасади на кланицама. У категорији товљеника, HEV RNK је доказана само у фецесу (7,27%), а HEV геном није потврђен нити у једном узорку јетре, жучи или меса.
9. Патохистолошким прегледом 26 узорака јетри прасади са позитивним RT-PCR налазом, код 3 узорка (11,53%) утврђене су микроскопске промене које одговарају неспецифичном хепатитису са лезијама II степена. Имунохистохемијском анализом није доказано присуство антигена хепатитис Е вируса.
10. На основу изнетих резултата испитивања дефинисан је предлог лабораторијског протокола за дијагностику хепатитис Е инфекције код свиња, у узорцима меса и јетри свиња у кланицама, као и код добровољних давалаца крви.
11. На основу налаза HEV RNK у јетрама и месу прасади може се закључити да постоји зоонотски потенцијал HEV инфекције. Истраживања је потребно наставити у правцу генотипизације и филогенетске анализе HEV изолата код свиња и људи, као и утврдити сличности и разлике добијених секвенци међусобним поређењем.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

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

Резултати испитивања су приказани текстуално, табеларно и графички и документовани са 24 табеле, 26 слика и 6 графикона. Текст је написан јасним и разумљивим стилом.

Резултати представљају најновија достигнућа истраживања у области ветеринарске вирусологије. Комисије сматра да су резултати истраживања изложени систематично, јасно и прегледно и оцењује начин приказа резултата позитивно.

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.

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

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Дисертација садржи све битне елементе који су неопходни за завршену докторску дисертацију

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци Хепатитис Е вирусна инфекција је одавно познато обољење људи, које у мање развијеним деловима света изазива епидемије значајних размера. Доказ хепатитис Е вируса свиња (1997 године) указао је на могућност зоонозног потенцијала вируса. Од тада су извршена многобројна испитивања и HEV инфекција је установљена код свиња и других животиња у многим земљама света и на свим континентима. У нашој земљи нису до сада вршена испитивања о присуству и раширености HEV инфекције код свиња и људи. Резултати овог истраживања представљају прве податке о присуству хепатитис Е вируса код свиња у индустријском начину узгоја и код људи у Србији. Доказ HEV RNK у узорцима меса и јетре прасади узоркованих у клиникама такође представљају најновије резултате истраживања која до сада нису вршена у нашој земљи. Развијене су лабораторијске технике: *in house* ЕЛИСА и Western blot метод, као потврдни метод у дијагностици ове инфекције. У испитивањима је примењена и савремена молекуларна метода real-time RT-PCR, као и патохистолошка и имунохистохемијска испитивања. Оригинални допринос науци представља предложени лабораторијски протокол за дијагностику хепатитис Е инфекције код свиња и људи и у узорцима меса и органа свиња на клиникама, да се уведе у рутинску дијагностику ове инфекције.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Комисија није установила недостатке докторске дисертације.

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

да се докторска дисертација са називом „Развој и примена различитих лабораторијских метода за дијагностиковање инфекције изазване хепатитис Е вирусом код свиња и људи“ прихвати, а кандидату мр сц. вет. мед. Диани Лупуловић одобри одбрана.

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА
КОМИСИЈЕ

1. др. Бранислав Лако, редовни професор, ментор

2. др Сава Лазвић, научни саветник

3. др Славица Кнежевић-Ушај, ванредни професор

4. др Младен Гагрчин, редовни професор

5. др Тамаш Петровић, виши научни сарадник

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.