

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: 23. III 2016. godina, 166. Sednica
10 Nastavno naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

11
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
16 1. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i
17 bolesti pčela i sviloprelja, 2011. godina, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u
18 Beogradu

19 2. Dr Miroslav Valčić, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i
20 bolesti pčela i sviloprelja 2010. godina, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u
21 Beogradu

22 3. Dr Vladimir Ivović, docent, Mikrobiologija, 2014. godina, Fakultet za matematiku,
23 prirodne nauke i informacione tehnologije Koper, Univerzitet Primorska, Republika Slovenija
24

25 II PODACI O KANDIDATU:

26
27 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Vesna Milovan Milićević

28
29 2. Datum rođenja, opština, Republika: 29. XII 1980. godina, Ivanjica, Republika Srbija
30

31 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*: 29. XII 2011. godine, Beograd
32 „Ispitivanje osetljivosti i specifičnosti molekularnih testova u dijagnostici klasične kuge svinja”
33

34 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*: Epizootiologija,
35 zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

36 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: „Ispitivanje raširenosti virusnih bolesti
37 enzootskog potencijala kod divljih svinja (*Sus scrofa*) i analiza rizika u regionu centralne
38 Srbije”

39 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
40 grafikona i sl.): Doktorska disertacija magistra Vesne Milićević napisana je na ukupno 183
41 strane kompjuterski obrađenog teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled
42 literature (53 strane), Cilj i zadaci istraživanja (1 strana), Materijal i metode (24 strane),
43 Rezultati (44 strane), Diskusija (20 strana), Zaključci (2 strane), Literatura (20 strana). Na
44 početku disertacije dat je kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku kao i sadržaj
45 doktorske disertacije, a na kraju se nalaze izjave, spisak skraćenica i kratka biografija
46 kandidata. Rad je dokumentovan sa 49 slika i 37 tabela. Spisak literature čini 181.
47 bibliografska jedinica od kojih je najstarija publikovana 1970. godine, a najnovija 2015.
48 godine.

49 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
50 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,
51 materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci): U Uvodu, kandidat ističe da
52 zarazne bolesti a posebno nove i preteće, imaju veliki uticaj na brojnost i biodiverzitet divljih

1 životinja, te da one nastaju kao posledica složenog odnosa ljudi, domaćih i divljih životinja.
2 Razumevanje veza između ovih karika lanca u značajnoj meri objašnjavaju nastanak,
3 prenošenje i širenje bolesti. Uz brojne druge faktore, infektivne bolesti mogu uticati na
4 određene vrste do mere ugrožavanja njihovog opstanka. Sa druge strane, smatra se da tri
5 četvrtine svih pretećih zaraznih bolesti čine zoonoze i da većina njih potiče od divljih životinja.
6 Pored njih, veliki je broj i onih koje nisu zoonoze, ali u značajnoj meri utiču na ekonomiju
7 zemalja u kojima se pojavljuju. Na lokalizaciju i pojavu bolesti utiču faktori vezani za
8 uzročnika, domaćina i ekosisteme odnosno okolinu. Divlje svinje su prijemčive za veliki broj
9 infektivnih bolesti, od kojih su samo neke ograničene na vrstu *Sus scrofa*, a mnogo veći broj
10 je zajednički za druge životinjske vrste i čoveka. Bolesti prisutne kod divljih svinja mogu da se
11 u određenim situacijama šire na domaće svinje što komplikuje epizootiološku situaciju i
12 predstavlja problem u zemljama koje te bolesti pokušavaju da iskorene. Na toj listi, pored
13 klasične nalazi se i afrička kuga svinja koja ima trend laganog širenja u zemljama Evropske
14 unije (Estonija i Poljska 2014. godina). Pored njih, reproduktivni i respiratorni sindrom svinja
15 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome PRRS), Aujeckijeva bolest (Morbus
16 Aujeszky, MA), parvoviroza svinja (Porcine Parvovirus PPV), infekcija cirkovirusom 2 (Porcine
17 Circovirus, PCV2), influenza svinja (Swine Influenza, SI) i transmisivni
18 gastroenteritis/respiratorni Corona virus svinja (TGEV/PRCV) dovode do velikih direktnih i
19 indirektnih materijalnih šteta. Precizni i sistematizovani podaci o stopi infekcije domaćih svinja
20 u Srbiji ovim virusima, izvorima infekcije, prenošenju sa divljih na domaće i u suprotnom
21 smeru, prostornoj i vremenskoj distribuciji nisu dostupni. Uz to, epizootiološka situacija kod
22 divljih svinja, osim klasične i afričke kuge svinja i delimično Aujeckijeve bolesti, nije poznata.
23 Domaće životinje, koje se i dalje u najvećoj meri drže ekstenzivno i na otvorenom, u direktnoj
24 su vezi sa divljim životinjama, što ne isključuje ni mogućnost direktnog prenosa bolesti sa
25 divljih na domaće svinje.

26 Za sprečavanje kontakata između divljih i domaćih životinja primenjuju se biosigurnosne mere
27 koje podrazumevaju funkcionalno i teritorijalno razdvajanje; njihova efikasnost je u praksi
28 često nedovoljna, uglavnom zbog načina prenošenja bolesti. Iz tog razloga, ove mere su
29 najdelotvornije za bolesti koje se prenose polnim putem, a najmanje za bolesti koje se šire
30 aerogeno.

31 Broj divljih svinja u Evropi je u stalnom porastu. Smatra se da su blage zime i dobar rod žira
32 poslednjih godina, intenzivna poljoprivredna proizvodnja i prihranjivanje, razlog porasta broja
33 divljih svinja. Dostizanje rizične gustine broja jedinki može da omogući nekim bolestima kao
34 što je klasična kuga svinja opstanak u divljim svinjama u dužem vremenskom periodu što
35 predstavlja posebnu pretnju za svinjarstvo jedne zemlje u celini. Zbog navedenog, ispitivanje
36 prisustva virusnih bolesti kod divljih svinja u Srbiji ima poseban značaj s obzirom na
37 nedostatak informacija o epizootiološkoj situaciji, njihovoj raširenosti, trendu pojavljivanja;
38 dobijeni podaci bi omogućili procenu rizika koji divlje svinje predstavljaju za domaće i doprineli
39 razumevanju pojave i održavanja virusnih bolesti kod domaćih svinja. U poglavlju **Pregled**
40 **literature** kandidat daje detaljan opis vrste *Sus scrofa*, podatke o njenoj rasprostranjenosti,
41 ishrani, staništu, načinu razmnožavanja i ponašanja ove vrste. Zatim se navode podaci o
42 virusnim bolestima enzootskog potencijala za koje su domaćini svinje. Detaljno je obrađena
43 etiologija, rasprostranjenost, epizootijski proces, klinička slika i patomorfološki nalaz,
44 dijagnostika svih pobrojanih uzročnika (PRRS, MA, PPV, PCV2, SI i TGEV/PRCV), terapija i
45 kontrola sa posebnim osvrtom na pojavu bolesti kod divljih svinja. U trećem potpoglavlju
46 *Uloga i uticaj divljih svinja na kontrolu zaraznih bolesti kod domaćih svinja i analiza rizika od*
47 *prenošenja sa divljih na domaće svinje* opisano je održavanje bolesti kod divljih svinja, koje je
48 u funkciji veličine i gustine populacije, starosti, socijalnog statusa i teritorijalnosti divljih svinja,
49 kao i kretanje zaraza između divljih i domaćih svinja i analiza rizika.

50 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** određeno je da se uzorci poreklom od divljih svinja iz
51 centralne Srbije ispituju molekularnim, virusološkim i serološkim metodama na prisustvo
52 virusa i specifičnih antitela protiv Aujeckijeve bolesti (MA), parvoviroze (PPV), transmisivnog

1 gastroenteritisa (TGE), cirkoviroze (PCV2), reproduktivnog i respiratornog sindroma (PRRS)
2 kao i influence A (SIV). Na osnovu dobijenih rezultata kao cilj je postavljeno utvrđivanje
3 trenda pojavljivanja nabrojanih bolesti tokom trogodišnjeg vremenskog perioda, kao i
4 geografska rasprostranjenost i lociranje područja u kojima postoji rizik od prenošenja bolesti
5 sa divljih na domaće svinje. Cilj istraživanja je bio i poređenje dobijenih rezultata sa već
6 postojećom bankom virusa sa teritorije Republike Srbije, kao i sekvenciranje delova genoma i
7 poređenje sa istim sekvencama virusa izolovanih iz domaćih svinja; na osnovu dobijenih
8 rezultata uradila bi se filogenetska analiza i utvrdila srodnost izolata poreklom od domaćih i
9 divljih svinja.

10 Kako bi se ostvarili postavljeni ciljevi određeni su i zadaci istraživanja koji su obuhvatili:

- 11
- 12 1. Prikupljanje uzoraka krvnih seruma divljih svinja sa područja beogradskog, borskog,
13 braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog,
14 zaječarskog i zlatiborskog i okruga; prikupljanje uzoraka krvnih seruma i organa od
15 divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti;
- 16
- 17 2. Ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv uzročnika MA, PPV, TGEV/PRCV
18 PCV2, PRRS i SIV;
- 19
- 20 3. Ispitivanje uzoraka organa od bolesnih divljih svinja na prisustvo uzročnika navedenih
21 virusnih bolesti molekularnim metodama;
- 22
- 23 4. Izolacija i molekularna karakterizacija izolovanih sojeva i poređenje sa sojevima
24 virusa iz domaćih svinja;
- 25
- 26 5. Analiza rezultata u odnosu na utvrđenu vremensku i prostornu distribuciju bolesti kod
27 divljih svinja i gustinu i lokaciju domaćih svinja;
- 28
- 29 6. Analiza rizika od širenja nabrojanih virusnih bolesti sa divljih na domaće svinje.

30 U poglavlju **Materijal i metode** navode se detalji vezani za uzorke i metode. Za potrebe ovog
31 ispitivanja korišćeni su uzorci poreklom od divljih svinja sa područja 10 okruga centralne
32 Srbije: beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog,
33 šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog. U ispitivanju su korišćeni krvni serumi i organi divljih
34 svinja izlovljenih tokom redovnih sezona lova u periodu 2012-2014. godine, kao i divlje svinje
35 koje su pokazivale znakove bolesti, a izlovljene su tokom 2014. godine. U cilju poređenja i
36 karakterizacije sojeva virusa izolovanih iz divljih svinja, korišćeni su ranije izolovani virusi
37 Aujeckijeve bolesti iz pasa i domaćih svinja u Srbiji za koje su nukleotidne sekvence dostupne
38 u banci gena NCBI (National Center for Biotechnology Information) za us9, ul49,5 i us4 gene:
39 MA/domaća svinja/2009: KT187319, KT187325, KT187313; MA/pas/2010: KT187318,
40 KT187324, KT187312; MA/domaća svinja/2014: KT187320, KT187326, KT187314. Takođe,
41 korišćene su i druge dostupne sekvence iz NCBI.

42 Za svaku od 3 navedene godine, odabrano je po 200 krvnih seruma divljih svinja za serološka
43 ispitivanja. Pored uzoraka iz redovnog odstrela, pregledano je 50 krvnih seruma divljih svinja
44 koje su pokazivale znakove bolesti.

45 Krvni serumi su pregledani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PRRS-a, MA, PPV,
46 PCV2, SIV i TGEV/PRCV.

47 Divlje svinje koje su pokazivale znakove bolesti, izlovljene tokom 2014. godine pregledane su
48 molekularnim metodama na prisustvo genoma uzročnika virusnih bolesti enzootskog
49 potencijala. Ukupno je pregledano 50 uzoraka organa, slezine i bubrega. Uzorci za ova
50 ispitivanja poticali su iz 6 okruga i to: borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog,
51 raškog i zaječarskog.

1 Molekularne metode su korišćene kao trijažne; iz uzoraka u kojima je dokazan genom vršena
2 je izolacija virusa na kulturi tkiva i identifikacija izolovanih sojeva virusa primenom virus
3 neutralizacionog testa, direktne imunofluorescencije i histološkim hematoksilin eozin bojenjem
4 ćelija. Molekularna karakterizacija izolovanih sojeva virusa je izvršena sekvenciranjem i
5 filogenetskom analizom. U virus neutralizacionom testu za serološku dijagnostiku Aujeckijeve
6 bolesti je korišćen referentni soj virusa MA NIA 3 (CVI Wageningen, Lelstad, Holandija).
7 PPV NADL-2 (ATCC® VR-742) referentni soj parvovirusa svinja korišćen je u testu inhibicije
8 hemaglutinacije.
9 Izolacija virusa je izvršena na kontinuiranim ćelijskim linijama PK15 – BS CL 72, MDBK – BS
10 CL 63, RK13.6 – BS CL 196 (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e
11 dell'Emilia Romagna „Bruno Ubertini“). Identifikacija virusa Morbus Aujecki je izvršena
12 neutralizacijom virusa upotrebom antiseruma PRV S1, S2, S3 (CVI Wageningen, Lelstad,
13 The Netherlands).
14 Na ćelijskoj liniji PK15 je rađen i virus neutralizacioni test za dijagnostiku Aujeckijeve bolesti.
15 Za serološka ispitivanja korišćeni su komercijalni ELISA testovi: Ingezim PRRS UNIVERSAL,
16 ING 1.1PRU.K1, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija;
17 Ingezim Circovirus IgG/IgM ING1.1.PCV.K.2, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA
18 APLICADA, S.A, Španija; INGEZIM Influenza A, ING 1.0.FKU.K.3, proizvođača
19 INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija; Ingezim Corona Diferencial 2.0,
20 11.DIF.K3, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija (blokirajući
21 imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv virusa transmisivnog
22 gastroenteritisa i njihovo razlikovanje od antitela protiv PRCV). Određivanje prisustva i visine
23 titra specifičnih antitela protiv PPV-a svinja je izvedeno testom inhibicije hemaglutinacije, a za
24 dokazivanje i određivanje titra specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti korišćen je
25 virus neutralizacioni test.
26 Za izvođenje molekularnih metoda iz uzoraka organa divljih svinja koje su pokazivale znakove
27 bolesti, organi su prethodno pripremljeni kao 10% suspenzija u PBS-u. Za dalji postupak je
28 korišćen supernatant. Za izolaciju RNK je korišćen komercijalni kit QIAamp Viral Mini Kit
29 (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača. Izolacija DNK je izvedena upotrebom
30 komercijalnog kita QIAamp DNA Mini kitom (Qiagen, Nemačka). Za umnožavanje i
31 dokazivanje delova genoma specifičnih za ispitujuće viruse, korišćene su gotove,
32 komercijalne reakcije smeše i prajmeri prikazani u tabeli 1.

33 Tabela 1: Spisak prajmera i delova i dužine genoma za koji su specifični

Virus	Prajmeri	Dužina PCR proizvoda (bp)	Region
ADV	F: MA1 – GCCAGCCGTACACGCAG R: MA2 – CCGTAGCAGAGGCTCCCC	294	gG (us4)
	F: GAGAAACCGGAAGTGACGAA R: GGGGCCCATTTATTGTGAC	550	us9
	F: CCCAGGGGAACCTTATAAAATC R: TTTCTCGAGCTGGACATGG	447	ul49,5
TGEV	F: T1 - GTGGTTTTGGTYRTAAATGC R: T2 - CACTAACCAACGTGGARCTA	859	S gen
PRRS	F: P1 5 - CCAGCCAGTCAATCARCTGTG R: P2 5 - GCGAATCAGGCGCACWGTATG	637	ORF 7
PCV2	F: PCV2 1 – CGGATATTGTAGTCCTGGTCG R: PCV2 2 – ACTGTCAAGGCTACACAGTCA	481	ORF 2

SIV	F: InfA F - GACCRATCCTGTACCTCTGAC R: InfA R - AGGGCATTYTGGACAAAACGCTCTA P: InfA P - TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	-	Matriks protein
PPV	F: PPV1 – CCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCAC R: PPV2 – GTCCATGTTGGTAATCCATTGTAATC	226	ORF 2

1
2 Reverzna transkripcija-lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) je korišćena za dokazivanje
3 RNK virusa, virus PRRS-a i TGEV (OneStep RT-PCR Kit: QIAGEN, Nemačka). Za
4 dokazivanje virusa influenza, takođe je korišćen RT-PCR test (TaqMan® One-Step RT-PCR
5 Master Mix Reagents Kit: Applied Biosystems, SAD), ali u realnom vremenu (RT-qPCR).

6 Za dokazivanje genoma DNK virusa, virus Aujeckijeve bolesti, PPV i PCV2, korišćen je PCR
7 test (HotStarTaq Master Mix Kit: Qiagen, Nemačka).

8 **Prečišćeni PCR proizvodi su sekvencirani u MacroGen Europe (Amsterdam, Holandija).**

9 Filogenetska analiza je izvršena upotrebom MEGA software version 6, Basic Local Alignment
10 Searching Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i sekvenci virusa Aujeckijeve
11 bolesti koje su dostupne u banci gena (NCBI).

12 Izolacija virusa je izvršena iz uzoraka organa u kojima je prethodno molekularnim tehnikama
13 utvrđeno prisustvo genoma virusa Aujeckijeve bolesti. Identifikacija je rađena uz pomoć testa
14 neutralizacije, direktne imunofluorescencije i histološkim hematoksilin eozin bojenjem.

15 Za testiranje značajnosti razlika u rezultatima između polova i starosnih kategorija korišćen je
16 Hi kvadrat test (χ^2) za dve i više proporcija, uz grešku od 5%. Pouzdanost od 95% (CI) za
17 standardne greške (SE) je izračunata prema obrascu: $se_{95\%} CI = 1.96(p[1-p])/n^{1/2}$. Za
18 izračunavanje statističkih parametara je korišćen Social Science Statistics website. Survey
19 Toolbox Version 1.0 beta softver je korišćen za izračunavanje prevalencije i dokazivanje
20 odsustva bolesti.

21 Analiza rezultata u odnosu na utvrđenu vremensku i prostornu distribuciju bolesti kod divljih
22 svinja i gustinu i lokaciju domaćih svinja izvršena je upotrebom softvera Quantum GIS 2.8.1
23 Wiena, ArcGIS i sistema za globalno pozicioniranje (global positioning system (GPS) - google
24 earth software (<http://earth.google.com/>). Na osnovnu administrativnu mapu Srbije u formatu
25 .shp, dodati su slojevi pripremljeni u .csv formatu za gustinu populacije domaćih svinja,
26 gustinu populacije divljih svinja, seroprevalenciju Aujeckijeve bolesti, PPV infekcije i PCV2
27 infekcije.

28 GPS koordinate za svaki pozitivan uzorak projektovane su u .kml vektorski sloj koji je dodat
29 na slojeve kojima se prikazuje gustina i seroprevalencija ispitujućih bolesti.

30 Korelacija pojave zarazne bolesti i gustine populacije divljih i domaćih svinja je izvršena
31 upotrebom Pirsonovog koeficijenta korelacije.

32 Analiza rizika od širenja zaraznih bolesti sa divljih na domaće svinje izvršena je kvalitativnom
33 metodom koju je osmislio Zepeda Sein. U ovom poglavlju nalazi se 1 slika i 19 tabela.

34 U poglavlju **Rezultati** prikazana je struktura uzoraka prikupljenih tokom tri godine, u odnosu
35 na starosnu kategoriju i pol životinja, prostornu i vremensku distribuciju.

36 Rezultati seroloških ispitivanja su pokazali da u 600 krvnih seruma uzorkovanih u periodu
37 2012-2014. godine komercijalnim ELISA testom nije dokazana serokonverzija za virus PRRS-
38 a. Korišćenjem softverskog paketa Survey Toolbox i podataka o osetljivosti (82,5%) i
39 specifičnosti (97%) ELISA testa, sa sigurnošću od 99,956% se može tvrditi da je PRRS
40 odsutan kod divljih svinja, odnosno da je prevalencija antitela protiv ovog uzročnika niža od
41 1%.

42 Za ispitivanje prisustva antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti korišćen je virus
43 neutralizacioni test, a titar antitela veći od 1:4 smatran je pozitivnim. Utvrđeno je da je za
44 poslednje 2 godine prevalencija seropozitivnih jedinki porasla sa 56% u 2012. godini na 72%
45 u 2013. odnosno 70% u 2014. godini.

46 Prevalencija antitela protiv ovog virusa kod različitih polova i starosnih kategorija bila je
47 različita. Kod mužjaka (n=238, 76%) prevalencija je viša nego kod ženki (n=156, 55%) što

1 predstavlja statistički značajnu razliku ($p=0,005$, $p<0,05$). Razlika u prevalenciji je statistički
2 značajna i kod različitih starosnih kategorija ($p=0,0001$, $p<0,05$) i bila je viša kod starijih od
3 1.5 godine u odnosu na mlađe kategorije (0-6 meseci i 6-18 meseci).
4 Razlike u prevalenciji su uočljive i na nivou okruga gde se kreću od 16% u zlatiborskom
5 okrugu u 2013. godini do 90% u šumadijskom okrugu u 2014. godini.
6 Prevalencija antitela protiv parvovirusa svinja kretala se oko 50%, a razlike u seroprevalenciji
7 između polova $p=0,469$, i starosnih kategorija $p=0,129$ nisu bile značajne ($p>0,05$). Tokom
8 trogodišnjeg ispitivanja seroprevalencija je bila ujednačena i nešto niža u zlatiborskom
9 okrugu.
10 Serokonverzija na PC2 virus kod divljih svinja je prisutna u manjem obimu u odnosu na
11 Aujeckijevu bolest i PPV infekciju, s tim da je prevalencija u 2014. godini značajno viša u
12 odnosu na 2012. i 2013. godinu. Nisu ustanovljene statistički značajne razlike u prevalenciji
13 kod različitih polova ($p=0,107$) i starosnih kategorija ($p=0,101$) ($p>0,05$). Aktivna infekcija je
14 dokazana u rasinskom i zlatiborskom okrugu, dok je na osnovu visine titra IgM i IgG
15 procenjeno da je infekcija u šumadijskom, braničevskom i borskom okrugu stara 1-2 meseca.
16 Specifična antitela protiv virusa influence svinja nisu dokazana ni u jednom od 600 ispitanih
17 krvnih seruma divljih svinja što na osnovu analize Survey Toolbox softverom potvrđuje
18 odsustvo (seroprevalencija niža od 1%) influence A kod divljih svinja sa sigurnošću od 100%.
19 Specifična antitela protiv virusa transmisivnog gastroenteritisa/respiratornog Coronavirusa
20 svinja nisu dokazana ni u jednom od 600 ispitanih krvnih seruma divljih svinja. Uzevši u obzir
21 da je osetljivost korišćenog ELISA testa (93,3%) a specifičnost (94,3%) sa sigurnošću od
22 100% se može smatrati da je TGE/PRCV infekcija odsutna kod divljih svinja, odnosno da je
23 prevalencija niža od 1%.
24 Uzorci bolesnih divljih svinja iz borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, raškog i
25 zaječarskog okruga su razvrstani prema polu i starosti. Ukupno je pregledano 50 divljih svinja,
26 64% muškog ($n=32$) i 36% ($n=18$) ženskog pola. U odnosu na starost, najviše divljih svinja je
27 pripadalo starosnoj kategoriji od 6 do 18 meseci ($n=32,64%$). U ostalim okruzima, nije bilo
28 prijavljenih divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti.
29 RT-PCR, RT-qPCR i PCR testom, genom virusa PRRS-a, transmisivnog
30 gastroenteritisa/PRCV, influence svinja, PPV i PCV2 nije dokazan u uzorcima organa
31 poreklom od divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti.
32 PCR testom kod 13 (26%) divljih svinja je dokazan genom virusa Aujeckijeve bolesti.
33 S obzirom na to da postoje značajne razlike u ponašanju divljih svinja različitih starosnih
34 kategorija i polova u smislu ostvarivanja efikasnih kontakata i mogućnosti nastanka zaraze,
35 rezultati su predstavljeni u odnosu na različite grupe divljih svinja.
36 Veći procenat PCR pozitivnih divljih svinja uočen je kod mužjaka ($n=10$, 31%) u poređenju sa
37 ženkama ($n=3,17%$), ali se ovaj rezultat ne može smatrati statistički značajnim ($p=0,21$,
38 $p>0,05$).
39 Većina PCR pozitivnih životinja je pripadala starosnoj grupi od 6 do 18 meseci ($n=12$, 92%);
40 ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0,32$, $p>0,05$).
41 Virus Aujeckijeve bolesti je izolovan na kulturi ćelija iz 4 od 13 uzoraka (30,8%) kod kojih je
42 prethodno dokazan genom ovog virusa.
43 Filogenetska analiza 4 izolovana soja i 9 uzoraka nukleinske kiseline iz pozitivnih materijala
44 virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena za 3 regiona virusa, us9, us4 i ul49,4 njihovim
45 poređenjem sa dostupnim sekvencama u banci gena kao i sa sekvencama virusa Aujeckijeve
46 bolesti izolovanih iz domaćih životinja sa teritorije naše zemlje. Pokazano je da su sojevi
47 virusa iz divljih svinja, ali i domaćih životinja, najbliži soju Kaplan; razlike između sojeva iz
48 divljih svinja i sojeva domaćih životinja bile su neznatne.
49 Najveća udaljenost između sojeva virusa iz divljih svinja i domaćih životinja je utvrđena za
50 us9 gen (3,2%), a zatim za ul49,5 gen. Međutim, gen us4 je identičan za sve sojeve
51 (udaljenost 0%). Upoređujući sekvence sojeva izolovanih iz divljih svinja i drugih sojeva koji
52 su korišćeni za konstruisanje filogenetskog stabla, utvrđena je najveća udaljenost za us9 gen

1 (3,1%), potom za ul49,5 (1,8%) i us4 gen (0,4%). Određena udaljenost, ali najviša za ul49,5
2 gen (3,9%), je utvrđena između vakcinalnog Bartha soja i sojeva izolovanih iz divljih svinja.
3 Analizom us9 gena, Neighbor-Joining metodom, obuhvaćena su 24 soja virusa Aujeckijeve
4 bolesti. Sojevi izolovani iz divljih svinja su registrovani u banci gena pod brojevima:
5 KT187315, KT187316, KT187317, KT273927, KT273928, KT273929, KT273930, KT273931.
6 Za filogenetsku analizu ul49,5 gena je korišćeno 26 dostupnih sekvenci. Filogenetsko stablo je
7 konstruisano Neighbor-Joining metodom, a sekvence domaćih sojeva virusa Aujeckijeve
8 bolesti su dostupne u NCBI pod brojevima: KT187321, KT187322, KT187323, KT273932,
9 KT273933, KT273934, KT273935, KT273938.

10 Za prikazivanje evolutivnog odnosa između sojeva virusa na osnovu us4 gena, korišćene su
11 23 sekvence i Neighbor-Joining metoda. Sekvence us4 gena sojeva virusa izolovanih iz divljih
12 svinja iz Srbije su dostupni u NCBI pod brojevima: KT187309, KT187310, KT187311,
13 KT273937, KT273938, KT273939, KT273940, KT273941.

14 Citopatogeni efekat je kod dva uzorka uočen već posle 24 h, a potom kod još dva, prvog za
15 48 h i drugog za 72 h. U narednoj pasaži iz uzoraka kod kojih nije došlo do pojave CPE, nije
16 izolovan virus Aujeckijeve bolesti. Ispitivanjem osetljivosti ćelijskih linija za virus Aujeckijeve
17 bolesti u odnosu na brzinu pojave CPE, utvrđeno je da je linija poreklom od svinja (PK15)
18 neznatno osetljivija od MDBK i RK13 na osnovu vremena potrebnog za ispoljavanje CPE.
19 Identitet virusa je potvrđen serum neutralizacionim testom i direktnom imunofluorescencijom.
20 Hematoksilin eozin bojenjem dokazane su karakteristične intranuklearne inkluzije koje se
21 pojavljuju kod herpes virusnih infekcija.

22 Od 50 pregledanih krvnih seruma divljih svinja sa simptomima bolesti, kod 64% (n=32) su
23 dokazana specifična antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti. Neznatno veći procenat divljih
24 svinja ženskog pola (n=12, 67%) je reagovao pozitivno u odnosu na muški pol (n=20, 63%)
25 ($p=0,63$, $p>0,05$). Statistički značajne razlike nisu utvrđene ni za različite starosne kategorije
26 ($p=0,05$).

27 Najveći broj divljih svinja imao je titar 1:8 (n=7, 22%) i 1:16 (n=6, 19%). Titar antitela 1:256
28 (n=2, 6%) i 1:512 (n=2, 6%) imale su životinje iz kategorija svinja starijih od 1,5 godine.

29 Zbog specifičnosti herpesvirusa da uspostavljaju latentne infekcije, serološki rezultati se
30 smatraju veoma korisnim u tumačenju rezultata molekularne dijagnostike.

31 Geografsko pozicioniranje izvršeno je korišćenjem različitih softverskih alata; na osnovu
32 geografskih koordinata, kreirane su mape na kojima je, po okruzima i godinama, prikazana
33 seroprevalencija predstavljena različitim intenzitetom boje i geografska pozicija seropozitivnih
34 divljih svinja.

35 Korišćenjem Pirsonovog koeficijenta korelacije, utvrđena je srednja pozitivna korelacija
36 između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije divljih svinja ($r=0,6$). Ovaj
37 rezultat ukazuje na postojanje direktne veze između broja divljih svinja-njihove gustine i
38 pojave Aujeckijeve bolesti.

39 Odnos prevalencije PPV ($r=-0,05$) i PCV2 ($r=-0,09$) infekcije i gustine populacije divljih svinja
40 prema Pirsonovom koeficijentu korelacije predstavlja blagu negativnu korelaciju. Prema
41 vrednostima koeficijenata r koji se približavaju nuli može se zaključiti da je korelacija između
42 ova dva parametra odsutna, tj. da pojava PPV i PCV2 infekcije nisu u funkciji gustine
43 populacije divljih svinja.

44 Za razliku od značaja gustine divljih svinja za pojavu Aujeckijeve bolesti, utvrđeno je da
45 brojnost tj. gustina domaćih svinja nema uticaja na pojavu ove bolesti kod divljih svinja ($r=-$
46 $0,2$). Slaba pozitivna korelacija je utvrđena između gustine populacije domaćih svinja i pojave
47 PPV infekcije ($r=0,05$) i PCV2 infekcije ($r=0,1$) kod divljih svinja.

48 Rizik od prenošenja bolesti sa divljih na domaće svinje je procenjen primenom kvalitativne
49 metode po Zepeda Seinu.

50 Analiza rizika je izvršena određivanjem stepena verovatnoće unosa virusa u populaciju
51 domaćih svinja, verovatnoće da domaće svinje dođu u kontakt sa virusom i procene posledica
52 koje bi nastale usled širenja bolesti sa divljih na domaće svinje.

1 Za procenu verovatnoće unosa virusa u populaciju divljih svinja, posmatrana su tri parametra:
2 prevalencija bolesti kod divljih svinja, mogućnost efikasnih kontakata između domaćih i divljih
3 svinja i karakteristika virusa.

4 Prevalencija Aujeckijeve bolesti je procenjena kao srednja za beogradski, moravički i
5 zlatiborski okrug i kao visoka u ostalih 7 okruga.

6 Prevalencija PCV2 infekcije je procenjena kao zanemarljiva u zaječarskom i zlatiborskom,
7 niska u borskom, braničevskom, raškom i šumadijskom okrugu i srednja u ostalim okruzima.

8 Prevalencija PPV infekcije je procenjena kao niska za zaječarski i zlatiborski, srednja za
9 borski, pomoravski, raški i šumadijski okrug i visoka za beogradski, braničevski, moravički i
10 rasinski okrug.

11 Ostvarivanjem efikasnih kontakata između domaćih i divljih svinja, omogućena je i razmena
12 patogena. Kontakti divljih i domaćih svinja su u funkciji gustine populacije divljih i domaćih
13 svinja za čije izražavanje se koristi numerička vrednost dobijena deljenjem broja divljih svinja
14 sa brojem domaćih svinja na nivou okruga. Ova vrednost se naziva indeksom broja divljih
15 svinja.

16 Zanemarljiv indeks broja divljih svinja je procenjen za beogradski, rasinski i šumadijski okrug,
17 nizak za braničevski, moravički i pomoravski okrug, dok je u ostalim okruzima visok. U
18 odsustvu direktnog kontakta, osetljivost virusa u spoljašnjoj sredini je od ključnog značaja za
19 prenošenje virusa sa divljih na domaće svinje. Visoka otpornost parvo i cirkovirusa svinja tip 2
20 u spoljašnjoj sredini povećava rizik od unošenja u grupe domaćih svinja: iz tih razluga za ove
21 dve bolesti rizik je procenjen kao visok. Pošto je virus Aujeckijeve bolesti srednje otporan u
22 spoljašnjoj sredini, samo na osnovu ove osobine rizik od unošenja ovog virusa u populaciju
23 domaćih svinja je procenjen kao srednji.

24 Verovatnoća da domaća svinja dođe u kontakt sa virusom poreklom od divljih svinja i da
25 potom dođe do širenja infekcije kod domaćih svinja je u funkciji postojanja kontakata između
26 domaćih i divljih svinja, načina prenošenja virusa i nastanka infekcije, najčešćeg načina
27 širenja kod domaćih svinja i karakteristika samog virusa.

28 Za izražavanje verovatnoće kontakta divljih i domaćih svinja korišćen je indeks broja divljih
29 svinja.

30 Ni jedna od ispitivanih bolesti se ne prenosi aerogeno; u njihovom prenošenju i širenju
31 najefikasniji je direktan kontakt zbog čega je rizik povezan sa načinom širenja infekcije
32 okarakterisan kao nizak.

33 Uslov za održavanje infekcije je pored postojanja prijemčivih životinja i način njenog širenja. U
34 tom smislu je analizirana gustina populacije domaćih svinja zbog potencijalnog rizika za
35 održavanje unete bolesti u toj grupaciji životinja.

36 Broj domaćih svinja odnosno gustina je najviša u beogradskom i rasinskom okrugu, te je i
37 rizik u funkciji ovog parametra visok. Srednji rizik je procenjen za braničevski i pomoravski,
38 nizak za moravički, šumadijski i zaječarski, a zanemarljiv za borski, raški i zlatiborski.

39 Visok rizik za prenošenje Aujeckijeve bolesti i PPV infekcije je procenjen za borski, raški i
40 zlatiborski. Visok rizik od prenošenja Aujeckijeve bolesti je procenjen za zaječarski okrug. Za
41 ostale okruge i bolesti, rizik je srednji.

42 U poglavlju **Diskusija** kandidat na celovit način povezuje dobijene rezultate sa najnovijim
43 podacima iz literature. Na kraju poglavlja, uzevši u obzir virusološke i serološke rezultate,
44 pretpostavlja da se u trenutku uzorkovanja u braničevskom i zaječarskom okrugu dešavala
45 aktivna infekcija virusom Aujeckijeve bolesti. Kao dokaze za ovu hipotezu kandidat navodi:

- 46 1. Uspešnu izolaciju virusa Aujeckijeve bolesti iz tkiva divljih svinja koje su pokazivale
47 znakove bolesti (depresija, otežano disanje, usporeno kretanje),
- 48 2. Izolovani virusi doveli su do formiranja veoma razvijenog sincicijuma na ćelijskim
49 linijama,
- 50 3. Odsustvo ili nizak VN titar kod virus pozitivnih životinja i
- 51 4. Odsustvo drugih virusnih bolesti koje imaju slične simptome.

52

1 U poglavlju **Diskusija**, sumirajući celokupne rezultate istraživanja, kandidat navodi da se
2 epizootična situacija kod divljih svinja može smatrati povoljnom. Bolesti koje su enzootske
3 u centralnoj Srbiji su Aujeckijeva bolest, parvoviroza i cirkoviroza tip 2. Sve tri bolesti su
4 prirodni regulatori broja divljih svinja, a uz to PCV2 modifikuje i genetsku strukturu populacije
5 favorizujući heterozigote. Kao povoljnu okolnost kandidat navodi i odsustvo bolesti
6 karakterističnih za intenzivnu proizvodnju svinja: PRRS, influencu svinja i TGE/PRCV
7 infekciju.

8 Iako se divlje svinje smatraju rezervoarima mnogih bolesti od kojih su neke u ovom radu i
9 dokazane, treba raditi na očuvanju ovakvog stanja i očuvanju prirodne ravnoteže koja je
10 između bolesti i divljih svinja u posmatranom vremenskom period očigledno uspostavljena.

11 Na kraju doktorske disertacije je poglavlje **Literatura** u kome je dat spisak 181. relevantne
12 reference stranih i domaćih autora.

13 VI **ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 14 **disertaciji):**

- 15
16 1. Na osnovu trogodišnjeg ispitivanja prisustva i seroprevalencije virusnih bolesti
17 enzootskog potencijala kod divljih svinja iz beogradskog, borskog, braničevskog,
18 moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog, zaječarskog i
19 zlatiborskog okruga, utvrđeno je da se Aujeckijeva bolest, parvoviroza i cirkoviroza
20 tip 2 enzootski pojavljuju kod divljih svinja.
- 21 2. Serološkim ispitivanjem 600 uzoraka krvnih seruma uzorkovanih u periodu 2012-
22 2014. godine, utvrđeno je da su divlje svinje sa područja beogradskog, borskog,
23 braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog,
24 zaječarskog i zlatiborskog okruga bile slobodne od PRRS-a, influence svinja i
25 TGE/PRCV infekcije.
- 26 3. Serološkim ispitivanjima u trogodišnjem periodu, utvrđeno je da se u zlatiborskom
27 okrugu PCV2 infekcija prvi put pojavila 2014. godine.
- 28 4. Istraživanjem faktora vezanih za pojavu bolesti, utvrđena je direktna zavisnost
29 između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije, pola i starosti divljih
30 svinja.
- 31 5. Ispitivanjem organa divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti, molekularnim i
32 virusološkim metodama dokazan je virus Aujeckijeve bolesti.
- 33 6. Virus Aujeckijeve bolesti je uspešno izolovan na ćelijskim linijama PK15, MDBK i
34 RK13. U ovom ispitivanju PK15 je bila najosetljivija ćelijska linija za izolaciju virusa
35 Aujeckijeve bolesti iz organa divljih svinja.
- 36 7. Filogenetskom analizom tri gena virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih od divljih svinja,
37 utvrđena je sličnost sa sojevima virusa iz domaćih životinja, ali različito poreklo
38 virusa.
- 39 8. Filogenetskom analizom, utvrđeno je da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani iz
40 divljih svinja ne potiču od vakcinalnog Bartha soja.
- 41 9. Na osnovu rezultata seroloških, molekularnih i virusoloških ispitivanja, utvrđeno je da
42 je Aujeckijeva bolest bila uzrok povećane incidencije bolesnih divljih svinja u
43 braničevskom i zaječarskom okrugu.
- 44 10. Na osnovu podataka o seroprevalenciji, gustini populacija divljih i domaćih svinja i
45 karakteristika virusa, utvrđen je visok rizik od širenja Aujeckijeve bolesti sa divljih na
46 domaće svinje za raški, zlatiborski i borski okrug.

1 11. Na osnovu podataka o seroprevalenciji, gustini populacija divljih i domaćih svinja i
2 karakteristika virusa, utvrđen je visok rizik od širenja PPV infekcije sa divljih na
3 domaće svinje u zaječarskom okrugu.

4 12. Na osnovu rezultata trogodišnjih ispitivanja, utvrđeno je da je epizootička
5 situacija kod divljih svinja za Aujeckijevu bolest, PPV i PCV2 infekciju stabilna, a za
6 PRRS, influencu svinja i TGE/PRCV infekciju povoljna.

7
8 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
9 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
10 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):** Prikaz i tumačenje rezultata istraživanja su u
11 skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije. Dobijene rezultate kandidat je
12 prikazao tabelarno i slikama; njihovi opisi i tumačenja su jasni, detaljni i sveobuhvatni, u
13 skladu sa najnovijim naučnim saznanjima. Izvedeni zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata,
14 logični su i jasno formulisani.

15 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

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

17 Doktorska disertacija kandidata Vesne Milićević pod naslovom „Ispitivanje raširenosti virusnih
18 bolesti enzootskog potencijala kod divljih svinja (*Sus scrofa*) i analiza rizika u regionu
19 centralne Srbije“ je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

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

21 Doktorska disertacija kandidata Vesne Milićević pod naslovom „Ispitivanje raširenosti virusnih
22 bolesti enzootskog potencijala kod divljih svinja (*Sus scrofa*) i analiza rizika u regionu
23 centralne Srbije“ sadrži sve elemente i u skladu je sa zahtevima koji su propisani za završenu
24 doktorsku disertaciju.

25 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

26 U doktorskoj disertaciji mr Vesne Milićević DVM, originalni doprinos nauci leži u celovitom
27 serološkom, molekularnom i virusološkom ispitivanju šest uzročnika enzootskih bolesti divljih
28 svinja i proceni aktuelne epizootičke situacije u regionu centralne Srbije. Tokom ovog
29 istraživanja po prvi put je potvrđeno prisustvo Aujeckijeve bolesti kod divljih svinja, što je
30 dokazano izolacijom i genetskom tipizacijom izolovanih sojeva virusa. Nukleotidne sekvence
31 tri gena su registrovane u banci gena pod brojevima- us9 gen- KT187315, KT187316,
32 KT187317, KT273927, KT273928, KT273929, KT273930, KT273931; ul49,5 gen-KT187321,
33 KT187322, KT187323, KT273932, KT273933, KT273934, KT273935, KT273938; us4 gen-
34 KT187309, KT187310, KT187311, KT273937, KT273938, KT273939, KT273940, KT273941.

35 To su ujedno i prve sekvence virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od divljih svinja dostupne
36 sa ovog područja. U cilju utvrđivanja odnosa izolata virusa iz domaćih i divljih svinja, po prvi
37 put je izvršeno sekvenciranje navedenih gena sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih iz
38 domaćih životinja. Te sekvence su takođe registrovane u banci gena (KT187319, KT187325,
39 KT187313, KT187318, KT187324, KT187312, KT187320, KT187326, KT187314) i
40 predstavljaju prve dostupne podatke o sojevima ovog virusa izolovanih iz domaćih životinja sa
41 teritorije naše zemlje. Uz to, potvrđena je do sada neotkrivena aktivna infekcija divljih svinja
42 cirkovirusom tip 2 u dva okruga centralne Srbije. Uzevši u obzir sve faktore vezane za
43 pojavljivanje i širenje bolesti enzootskog potencijala, izvršena je analiza rizika od prenošenja
44 bolesti sa divljih na domaće svinje. Nivo rizika je definisan za sve okruge centralne Srbije i
45 sve navedene viruse što predstavlja prve objavljene podatke ovog tipa u Srbiji.

46 47 **IX PREDLOG:**

48
49 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
50 **ponuđenih mogućnosti):**

51
52 **- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
53

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

DATUM
U Beogradu
8.IV 2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor,
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Miroslav Valčić, redovni profesor,
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir Ivović, docent
Fakultet za matematiku, prirodne nauke i informacione tehnologije
Univerzitet Primorska, Koper, Republika Slovenija
