

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

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 1. **Датум и назив органа који је именовео комисију:** Наставно-научно веће Факултета
10 ветеринарске медицине Универзитета у Београду на 178. седници одржаној 21.06. 2017.
11 године.

12
13 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

- 16
17 1. др Мирјана Димитријевић, ванредни професор, Хигијена и технологија меса,
18 2014. год., Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
- 19 2. др Бранко Велебит, виши научни сарадник, 2016. год., Институт за хигијену
20 и технологију меса, Београд
- 21 3. др Владо Теодоровић, редовни професор, Хигијена и технологија меса,
22 2007. год., Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду.
- 23 4. др Неђељко Карабасил, ванредни професор, Хигијена и технологија меса,
24 2013. год., Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
- 25 5. Др Дејан Видановић - научни сарадник, Микробиологија са имунологијом,
26 2012 год., Ветеринарски специјалистички институт „Краљево“.

27
28
29 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

- 30
31 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Невена, Небојша, Илић
- 32
33 2. **Датум рођења, општина, Република:** 01.04.1989., Косовска Митровица, Србија.
- 34
35 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**
- 36
37 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

38
39 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

40
41 „Идентификација и филогенетска анализа норовируса пореклом из дагњи (*Mytilus*
42 *galloprovincialis*) са аспекта безбедности хране“

43
44 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
45 **шема, графика и сл.):**

46
47 Докторска дисертација Невене Илић написана је на 100 страна текста и садржи
48 следећа поглавља: Увод (3 стране), Преглед литературе (27 страна), Циљеви и задаци
49 истраживања (две стране), Материјал и методе истраживања (15 страна), Резултати
50 истраживања (21 страна), Дискусија (13 страна), Закључци (две стране) и Списак
51 литературе (17 страна). На почетку дисертације дат је кратак садржај на српском и
52 енглеском језику. Дисертација је документована са 10 табела, 8 графика и 22 слике.

1 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
2 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
3 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**
4

5 У **Уводу** кандидат истиче да намирнице које се користе у исхрани људи могу бити извор
6 широког спектра узročника болести преносивих храном и да њихова конзумација може
7 представљати ризик за здравље потрошача. Вируси, као један од могућих узročника,
8 веома су распрострањени и представљају све већи проблем са аспекта безбедности
9 хране и јавног здравља људи. Норовирус је главни изазивач небактеријског акутног
10 гастроентеритиса, који се јавља широм света и у свим старосним категоријама. Према
11 последњем извештају из 2015. године (EFSA-European Food Safety Authority),
12 окарактерисани су као најчешћи узročник епидемија које се преносе храном. О њима се
13 зна много мање него о бактеријама и осталим патогенима, а разлог томе је, што се о
14 вирусима, као изазивачима болести, размишља тек када се бактеријска обољења
15 искључе. Поред тога, вируси се јако тешко изолују из матрикса хране, па захтевају
16 различите технике екстракције и обраде материјала. Иако је грађа вируса проучена до
17 детаља, терапија вирусних болести се обично не примењује, а број антивирусних лекова
18 је мали и скопчан са бројним нежељеним ефектима. За разлику од бактерија, вируси се
19 у храни не размножавају, те да никада неће довести до њених органолептичких
20 промена. У спољашњој средини су јако отпорни али и инфективност задрже дужи
21 временски период. Фецесом инфицираних људи се излучује велики број вирусних
22 партикула (10^5 - 10^{11}), а само неколико (1-100) може изазвати инфекцију. Храна може
23 бити примарно контаминирана вирусима, или накнадно током читавог ланца
24 производње. Шкољке, као организми који се хране филтрирањем морске воде, могу
25 концентрисати вирусе који се у њој налазе, па постају, са становишта безбедности
26 хране ризична намирница, нарочито ако се једу сирове или недовољно термички
27 обрађене. Иако су многе студије показале да број бактерија није у корелацији са нивоом
28 вирусне контаминације, санитарна контрола дагњи се и даље заснива на детекцији
29 бактеријских индикатора као што је *Escherichia coli*. Једини начин детекције норовируса
30 је примена савремених молекуларних метода као што су *Reverse transcription*
31 *polymerase chain reaction* (RT-PCR) и Real-Time RT-PCR. С обзиром на све наведене
32 податке, закључује се да вируси који се преносе храном представљају сложени
33 проблем и да је потребна квалитетна сарадња и координација здравствених и
34 ветеринарских установа, које су укључене у процес надзора и производње здравствено
35 безбедних намирница. Резултати овог истраживања указују на потенцијалан ризик од
36 појаве вирусних болести преносивих храном и подстичу интерес за испитивање шкољки
37 на тржишту, пореклом са различитих производних подручја. Такође, доприносе развоју
38 плана мониторинга шкољки на присуство норовируса. Поред тога, реализација ове
39 дисертације могла би да омогући подизање капацитета за развој молекуларно-
40 гететичких метода дијагностиковања вируса у храни. Утврђивањем нуклеотидног
41 састава, односно редоследа аминокиселина, одређен је положај норовируса доказаних
42 са ових подручја на светском филогенетском стаблу и утврђена је генетска повезаност
43 између доказаних изолата и оних раније описаних у свету. Поређењем са
44 микробиолошким и физичко-хемијским параметрима акваторијума утврђено је колико
45 они имају утицаја на присуство и налаз вируса у шкољкама.

46
47 У поглављу **Преглед литературе** приказана су досадашња научна сазнања о
48 таксономији, грађи вирусног генома, епидемиологији вируса, патогенези, клиничким
49 симптомима, дијагностици, терапији и превенцији појаве инфекција изазваних
50 норовирусом. Такође, дат је преглед утицаја физичко-хемијских параметара животне
51 средине на норовирусне и описани су биоиндикатори вирусне контаминације хране.
52 Осим постојећих података о методама које су се некада користиле, посебно су описане
53 молекуларне методе које представљају напредак и прекретницу у развоју вирусолошке
54 дијагностике.
55

56 **Циљ истраживања** у оквиру ове докторске дисертације био је да се применом
57 молекуларно-генетичких техника утврди присуство, као и да се изврши идентификација
58 и генотипизација норовируса у дагњама (*Mytilus galloprovincialis*) током свих месеци у
59 години. Потом би се испитала филогенетска повезаност између норовируса

1 детектованих у дагњама са оним раније изолованим и описаним у свету. Такође, циљ је
2 и да се утврди међусобна повезаност између присуства норовируса у шкољкама са:
3 фекалном контаминацијом (број *E. coli*) дагњи, физичко-хемијским параметрима
4 квалитета морске воде (температура, салинитет, рН, засићење кисеоником),
5 микробиолошким параметрима морске воде (укупне и фекалне колиформне бактерије,
6 *E.coli* и интерстиналне ентерококе) квантитативном и квалитативном анализом
7 фитопланктонске компоненте и концентрацијом хлорофила у акваторијумима. За
8 остварење ових циљева постављени су следећи задаци:

- 9
- 10 1. Прикупити узорке живих дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) и морске воде у
11 једногодишњем периоду, током сваког месеца, од јула 2015. године до јула
12 2016. године, из 6 регистрованих узгајалишта са различитих локација у Црној
13 Гори.
- 14 2. Обрадити и припремити прикупљене узорке дагњи, тако да дигестивна
15 жлезда буде спремна за екстракцију вирусне РНК (дисекција и лизирање).
- 16 3. Извршити екстракцију вирусне РНК коришћењем комерцијалног сета за
17 екстракцију.
- 18 4. Применом методе *Real-Time RT-PCR* испитати припремљене узорке дагњи
19 на присуство норовируса.
- 20 5. Утврђивањем нуклеотидног распореда и применом филогенетске анализе
21 испитати генетску повезаност између доказаних изолата и оних раније
22 описаних у свету.
- 23 6. Прикупити узорке морске воде и испитати њене физичко-хемијске
24 параметаре: температуру, салинитет, рН вредност и засићеност кисеоником,
25 затим одредити број укупних и фекалних колиформних бактерија, *E.coli* и
26 интестиналних ентерокока у води, и урадити анализе фитопланктонске
27 компоненте и концентрацију хлорофила а.
- 28 7. Одредити највероватнији број бактерија *E. coli* из дагњи (*Mytilus*
29 *galloprovincialis*).
- 30 8. Систематизовати, статистичка обрадити резултате и извршити њихову
31 упоредну анализу.

32

33 У поглављу **Материјал и методе истраживања** приказани су детаљи
34 експерименталног рада.

35 **А. Материјал**

36 Испитивани узорци дагњи су на тржиште наше земље пристигли са 6 регистрованих
37 узгајалишта из црногорског акваторијума. Узгајалишта дагњи су: Љута, Брбат,
38 Ораховац, Липци, Соила и Света неђеља, налазе се у Бококоторском заливу и део су
39 Јадранске обале. Сакупљено је 1000 дагњи, од којих су сачињена 72 композитна
40 узорка.

41 Живе дагње су директно транспортоване у лабораторију, опране под млазом топле
42 воде, како би се одстраниле нечистоће и алге на њиховој површини, а затим су
43 љуштуре отворене стерилним ножем, на тачно одређеном месту. Након тога, одвојено
44 је ткиво хепатопанкреаса сваке дагње и припремљен је збирни узорак, којег је чинило
45 од 8-15 дагњи. Узорак је одмерен у количини од $2 \pm 0,2$ г и пребачен у стерилну
46 епрувету, а потом замрзаван при температури од -80°C .

47

48 **Б. Методе**

49 Узорци су хомогенизовани у Петријевим шољама, до кашасте конзистенције, помоћу
50 маказа и стерилне пинцете.

51 За одређивање највероватнијег броја *E.coli* у дагњама, коришћено је 50 г хомогената,
52 сачињеног од меса и интравалвуларне течности са додатком 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-
53 beta-D-glucuronida.

1 Узимање узорака морске воде за хидрографска, микробиолошка и биолошка
2 испитивања вршено је помоћу Niskin-ове боце запремине од 5 л, на дубини од 0,5 м.
3 Морска вода је узоркована на истом месту и у исто време када и дагње.

4 1. Микробиолошка испитивања

- 6 • Одређивање *E. coli* и укупних колиформних бактерија према ISO 9308-1:2015-
7 *Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1:*
8 *Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora* и цревне
9 ентерококе према ISO 7899-2:2011 *Water quality -- Detection and enumeration of*
10 *intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method.*
- 11 • Одређивање највероватнијег броја *E. coli* из дагњи (*Mytilus galloprovincialis*)
12 према ISO TS 16649-3:2005 *Microbiology of food and animal feeding stuffs.*
13 *Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli.*
14 *Most probable number technique. ISO Norm 7251:2005. International Standardization*
15 *Organization ed., Geneva, Switzerland.*

17 2. Физичко-хемијска испитивања

- 18 • Физичко-хемијски параметри квалитета морске воде добијени су аутоматским
19 сондама *MultiLine 4, WTW*, одобрених од стране надлежног органа, по
20 упутствима произвођача.
- 21 • Садржај засићеног кисеоника одређиван је титрацијом, методом по Winkleru.

22 3. Квантитативна и квалитативна анализа фитопланктонске компоненте и хлорофила:

- 23 • Анализа фитопланктонског материјала вршена је по стандардној методологији
24 по Utermöhl-у (Utermöhl, 1958).
- 25 • Детерминација хлорофила рађена је стандардном спектрофотометријском
26 методом за екстракцију пигмената по APHA (1995) и Jeffrey-у (1997).

27 4. Молекуларне методе

28 Идентификација вирусне РНК вршена је амплификацијом високо-конзервисаног региона
29 РНК помоћу олигонуклеотида и комерцијалних реагенаса описаних у међународном
30 стандарду ISO 15216:2013 *Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for*
31 *determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 2:*
32 *Method for qualitative detection*, при чему један узорак чини око десет појединачних
33 дагњи (*Mytilus galloprovincialis*).

34 За амплификацију РНК коришћен је комерцијални сет Ultrasense One-step qRT-PCR
35 System (Life Technologies, Monza, Italy). Умножавање се вршило у једном кораку, у
36 континуираној реакцији, прво реверзна транскрипција, а затим умножавање дела
37 вирусног генома. За умножавање дела генома вируса оба генотипа коришћени су
38 раније дизајнирани специфични парови прајмера и проба према ISO TS 16649-3:2005:
39 QNIF4 (FW), NV1LCR (REV), TM9 (PROBE) за GI геногрупу и QNIF2 (FW), COG2R (REV)
40 и QNIFS (PROBE) за GII геногрупу. Реакције су биле изведене на Real-Time PCR
41 апарату Stratagene MX3005P thermalcycler.

42 У сврху потврде идентификације вирусне РНК рађено је секвенцирање у акредитованој
43 референтној лабораторији. За секвенцирање је коришћена Sanger Sequencing One Shot
44 Read техника на апарату Roche GS FLX Titanium 454. Ради што прецизније
45 идентификације секвенцирана су оба ланца фрагмента комплементарне ДНК.
46 Резултати секвенцирања представљени су у облику хроматограма и датотека у FASTA
47 формату. За идентификацију изолата коришћен је BLAST (Basic Local Alignment Search
48 Tool) софтвер за препознавање високосличних секвенци.

49 Примарна генотипизација норовируса извршена је коришћењем Norovirus genotyping
50 tool v.2.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). Након верификације о подударности

1 комплементарних нуклеотида, секвенце су упоређане са норовирусним секвенцама
2 доступним у банци гена (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).
3 За израду филогенетског стабла, из банке гена учитане су секвенце референтних
4 сојева за сваки генотип. Секвенце су поравнате помоћу алгорита Clustal W
5 имплементираних у програму MEGA 7. Након сравњивања одстрањени су некавалитетни
6 крајеви секвенци, па је добијена униформна секвенца (engl. alignment) од укупно 27
7 секвенци, свака дужине 250 базних парова.
8 Провера репродукцибилности специфичних карактеристика резултата филогенетске
9 анализе фрагмената ORF1 и ORF2 извршена је помоћу Neighbor-Joining (NJ) методе уз
10 самоучитавање 1000 (engl. bootstrap) и Kimura-2 еволутивни модел. Добијене секвенце
11 нуклеотида упоређене су са референтним секвенцама норовируса GI и GII.4 гена,
12 објављених у GenBank-у NCBI.

13 Д. Статистичке анализе

14 За статистичку анализу добијених резултата коришћени су дескриптивни статистички
15 показатељи: мера централне тенденције, стандардна девијација, стандардна грешка
16 аритметичке средине, интервал варијације и коефицијент варијације.
17 Даља статистичка анализа одвијала се у зависности од тога да ли су анализирани
18 подаци нормално дистрибуирани или не. Нормално дистрибуирани подаци
19 анализирани су Kolmogorov-Smirnov тестом. У случају нормалне дистрибуције података
20 за поређење сигнификантних разлика између експерименталних група коришћена је
21 параметарска анализа варијанси (One way analysis of variances).
22 У случају када дистрибуција података није нормална, употребљивана је не-
23 параметарска Kruskal-Vallisova анализа варијансе (Kruskal Wallis Analysis of Variance on
24 Ranks).
25 У случају да су постојале статистички сигнификантне разлике између група, парови
26 група су поређени међусобно на основу параметарског Tukey теста, односно не-
27 параметарског Dunn's Multiple Comparison теста и χ^2 (hi квадрат) теста.
28 Сигнификантност разлика установљавана је на нивоима значајности од 5 и 1 %.
29 Сви добијени резултати приказани су табеларно и графички. Статистичка анализа
30 изведеног експеримента урађена је у GraphPad Prism verzija 6.00 за Windows, (GraphPad
31 Software, San Diego, California USA), www.graphpad.com и MS Excel-у.
32

33 Поглавље **Резултати испитивања** подељено је у три целине, на основу резултата
34 испитивања молекуларно-генетичких анализа, физичко-хемијских и микробиолошких
35 анализа, а сходно постављеним задацима испитивања

36

37 У првом делу **Резултата испитивања** приказани су резултати присуства и
38 заступљености норовируса у испитиваном материјалу, пореклом из дигестивне жлезде
39 дагњи, употребом Real-Time RT-PCR методе базиране на „TaqMan“ пробама и применом
40 комерцијалног комплета хемикалија. Паралелно са амплификацијом гена за синтезу
41 капсида, односно ORF1/ORF2 регије, амплификован је фрагмент Менго вируса (MC0)
42 ради евалуације ефикасности екстракције. Ефикасност екстракције за све испитиване
43 узорке износила је од 3,08-6,21%, а резултати су сматрани прихватљивим уколико је
44 ефикасност екстракције $\geq 3\%$. Утврђено је да је од укупно 72 узорка, норовирус доказан
45 код 31 (43%) узорка дагњи. Обрадом резултата утврђено је да је норовирус присутан у
46 дагњама са свих испитиваних производних подручја. Са географске мапе ове обале,
47 види се да су тачке на којима су узорковане дагње геоспацијално веома блиске, те због
48 дистрибуције норовируса кретањем и струјама мора, налаз вируса у свим испитиваним
49 узгајалиштима није неочекиван. Највећи број позитивних узорака изолован је из дагњи
50 са узгајалишта Солила (9), а најмањи (2) са узгајалишта Љута.

51 Од укупно 31-ог узорка, позитивно идентификованих на присуство норовируса,
52 коришћењем методе ISO 15216:2013 (Ст<35), код 4 (12,9%) узорка утврђено је
53 присуство норовируса геногрупе GI, а код 17 (54,8%) узорка норовирус геногрупе GII,
54 док је код 10 (32,3%) узорка утврђено истовремено присуство норовируса обе геногрупе
55 (GI+GII).

56 Сви позитивни узорци су затим подвргнути амплификацији одговарајућих секвенци
57 ORF2 региона ради генотипизације и испитивања филогенетске сродности поређењем
58 са подацима из Genbank базе.

1 Од 14 узорка позитивних на норовирус геногрупе GI (4 позитивна само на GI и 10
2 позитивних и на GI и на GII), код само 4 узорка дошло је до успешне амплификације
3 ORF2 секвенце величине 330 bp, карактеристичне за геногрупу GI. Разлог томе је
4 недовољна количина генерисане комплементарне ДНК која би се могла користити за
5 секвенцирање. Коришћењем *on line* софтвера *Norovirus genotyping tool v. 2.0*
6 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool> , RIVM, Holandija), утврђено је да сва 4 узорка
7 норовируса геногрупе GI припадају генотипу GI.2.

8 Од 27 узорка позитивних на норовирус геногрупе GII (17 позитивних само на GII и 10
9 позитивних и на GI и на GII), код 13 узорка дошло је до успешне амплификације ORF2
10 секвенце, величине 340 bp карактеристичне за геногрупу GII. Коришћењем истог
11 софтвера, утврђено је да 12 узорка (92,31%) припада генотипу GII.4, док 1 узорак
12 (7,69%) припада генотипу GII.2.

13 Вируси су генотипизовани на основу редоследа нуклеотида за фрагмент ORF2,
14 величине 250 нуклеотида. Коришћењем резултата Neighbor Joining анализе, израђено
15 је консезусно стабло које приказује филогенетску повезаност између 4 секвенце GI.2
16 изоловане у овом испитивању и 29 референтних секвенци преузетих из банке гена.
17 Истом анализом израђено је консезусно стабло које приказује филогенетску повезаност
18 између 12 секвенци GII.4 из нашег испитивања и 30 референтних секвенци преузетих из
19 банке гена.

20 У другом делу **Резултата испитивања** приказани су резултати физичко-хемијских
21 параметара морске воде. Приказане су дескриптивне статистичке вредности за
22 температуру воде, салинитет и рН морске воде. Анализом просечне вредности
23 температуре воде, установљено је да су вредности у свих 6 узгајалишта приближне и
24 да нема већих варирања. Нису установљене сигнификантне разлике између просечних
25 вредности температура воде по узгајалиштима ($p > 0,05$). Такође је установљено да
26 нема сигнификантне разлике између просечних вредности салинитета између
27 узгајалишта ($p > 0,05$). Поред тога, није установљена статистичка корелација између
28 сезонског појављивања норовируса и варијације салинитета.

29 Просечна вредност рН била је у границама нормале за морску воду и кретала се од
30 8,14-8,18. Ни у овом случају није установљена статистичка корелација између сезонског
31 појављивања норовируса и варијације рН вредности морске воде, али такође ни
32 корелација између варијације засићености кисеоника и појаве норовируса.

33 Детаљна анализа само позитивних узорка, по месецима, показала је да је број
34 позитивних узорка током јуна, јула и августа, односно током летње сезоне (3 узорка)
35 била значајно нижа ($p < 0,05$) него број позитивних узорка откривена током јесени (10
36 узорка) и зиме (12 узорка).

37 Статистичком анализом је установљено да се са смањењем температуре мора
38 статистички значајно ($p < 0,01$) повећава појава вируса у испитиваним узгајалиштима.
39 Анализирајући појаву вируса по годишњим добима установљена је сигнификантна
40 разлика у току лета ($p < 0,01$) где се температура морске воде повећава, а број
41 позитивних узорка се смањује, док у току зимских месеци долази до пада температуре
42 воде, а број позитивних узорка расте.

43 У трећем делу **Резултата испитивања** приказани су микробиолошки параметри,
44 односно највероватнији број бактерија индикатора фекалног загађења (*E.coli*) у
45 дагњама, у току целог испитиваног периода, као и корелација између појаве норовируса
46 и броја бактерија. На основу броја (*E.coli*) у дагњама, према важећем европском
47 стандарду, укупно 48 од 72 испитивана узорка, била су из узгајалишта која крипадају
48 класи А, односно имају < 230 MPN/100 g меса и међуљуштуларне течности. Остала 24
49 узорка прикупљена су из области која се класификују као класа Б, где је је број
50 бактерија *E.coli* у дагњама већи од дозвољеног и дагње се не смеју конзумирати
51 сирове, без претходне обраде.

52 Годишња статистичка анализа узорка, који потичу из ових производних области,
53 указала је да су подручја чешће категоризована као класа А у пролеће ($p < 0,05$) и лето
54 ($p < 0,01$), у односу на јесен и зиму ($p > 0,05$). У узорцима кој имају < 230 MPN/100 g *E.*
55 *coli*, 31,2% узорка је било позитивно на норовирус (15/48 узорка). Наши резултати
56 указују да шкољке могу преносити норовирус чак и када је број *E. coli* испод границе
57 бактеријског ризика прописане Европском регулативом 854/2004.

58 На основу резултата добијених за микробиолошке параметре морске воде, односно
59 броја укупних колиформа, фекалних колиформа, *E. coli* и интерстицијаних ентерокока,
60 може се закључити да квалитет воде у испитиваним узгајалиштима углавном не

1 одговара квалитету вода које се могу користити за узгој шкољки. Микробиолошка
2 анализа морске воде, на основу броја бактерија које се у њој налазе, не даје стварну
3 слику о квалитету воде, обзиром на то да се вирус појављивао и у оним месецима када
4 је вода у испуњавала критеријуме за узгој дагњи. Самим тим, закључено је да
5 микробиолошки параметри морске воде не могу да буду индикатори појаве вируса у
6 дагњама.

7 Са аспекта праћења динамике раста фитопланктона кроз сезонске циклусе могло би се
8 рећи да је подручје Залива прилично добро истражено на местима где се налазе
9 узгајалишта шкољки. Бујност фитопланктона је варијала у зависности од услова
10 спољашње средине. У јануару је била изузетно ниска, а са пролећа почиње да буја
11 услед повишене температуре воде, да би опет у току зимских месеци опала.

12 Ови резултати указују да појава вируса не зависи од количине фитопланктона, тј. од
13 његове бујности у морској води. Фитопланктон у летњим месецима буја, док у то време
14 концентрација вируса у морској води опада. Само у септембру забележен је раст
15 фитопланктонске компоненте односно хлорофила *a*, али и појава вируса на свих 6
16 испитиваних узгајалишта. Сматра се да до ове појаве долази због велике количине
17 падавина у овом периоду године.

18 Биомаса фитопланктона изражава се преко хлорофила *a* (mg m^{-3}). Урађен је графички
19 приказ варијације концентрације хлорофила *a* по месецима. Концентрација хлорофила
20 *a* варијала је у току године и зависила од спољашњих фактора, те је на основу тих
21 података, закључено да концентрација хлорофила *a* није имала директног утицаја на
22 појаву и отпорност норовируса.

26 VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској 27 дисертацији):

28
29 На основу спроведеног испитивања и добијених резултата закључено је следеће:

30
31 1. Применом молекуларне методе Real Time RT-PCR доказано је присуство норовируса
32 у 41% испитиваних узорака дагњи.

33
34 2. У позитивно идентификованим узорцима, код 4 (12,9%) је утврђено присуство
35 норовируса геногрупе GI, а код 17 (54,8%) узорка норовирус геногрупе GII, док је код 10
36 (32,3%) узорка утврђено истовремено присуство норовируса обе геногрупе (GI+GII).

37
38 3. Методом генотипизације утврђено је да су сви детектовани норовируси геногрупе GI
39 припадали генотипу GI.2, док је већина детектованих норовируса геногрупе GII
40 припадала генотипу GII.4, изузев једног који је припадао генотипу GII.2.

41
42 4. Резултати филогенетске анализе указују на генетску сличност између норовируса
43 изолованих у овој дисертацији и оних раније описаних у свету. На основу нуклеотидне
44 секвенце испитаног ORF2 фрагмента сојева NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 утврђена је
45 сличност од 98,1% до 99,2% са изолатом Southampton virusa (L07418), а на нуклеотидне
46 секвенце испитаног ORF2 фрагмента сојева NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17,
47 22, 24 утврђена је сличност од 96,4% до 98,5% са изолатом Hu/GII.4/sydney/NSW05
48 (JX459908), тренутно најраспрострањенијем епидемијским сојем.

49
50 5. Установљена је сезонска варијација присуства норовируса у дагњама. Највећи је број
51 позитивних узорака забележен је током зимских месеци, односно у децембру, јануару и
52 фебруару, док је најмањи број позитивних узорака детектован у летњем периоду.

53
54 6. Статистичком анализом установљено је да се са смањењем температуре мора
55 статистички значајно повећава присуство вируса у испитиваним узорцима дагњи.
56 Остали испитивани физичко-хемијски параметри морске воде (pH, салинитет, засићење
57 кисеоником) нису имали статистички значајан утицај на појаву норовируса у дагњама.

58
59 7. Варијација бујности фитопланктонске компоненте и концентрација хлорофила *a* нису
60 имале статистички значајан утицај на појаву вируса у дагњама.

1
2 8. Није установљена статистички значајна корелација између микробиолошких
3 параметара морске воде и појаве вируса у дагњама.

4
5 9. Није установљена корелација између највероватнијег броја *E.coli* у дагњама и појаве
6 вируса у њима. Норовирус је установљен у 15 узорака који су иначе задовољавали
7 прописане критеријуме за највероватнији број *E.coli* у дагњама.

8
9 10. Добијени резултати истраживања указују на потребу успостављања плана
10 мониторинга присуства норовируса у дагњама, у циљу побољшања јавног здравља.

11
12 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
13 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**
14 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**
15 **резултата):**

16 Комисија сматра да су добијени резултати испитивања у складу са постављеним
17 циљем и задацима истраживања и да закључци ове докторске дисертације произилазе
18 из добијених резултата. Добијени резултати приказани су табеларно и графички и на
19 основу тога тумачени. Тумачење резултата је дато јасно и разумљиво.

20
21 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

22
23 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
24 **теме?**

25 Докторска дисертација је у свему написана у складу са образложењем наведеним у
26 пријави теме.

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

29 Докторска дисертација Невене Илић садржи све битне елементе који се захтевају за
30 завршену докторску дисертацију.

31 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

32 Докторска дисертација Невене Илић је оригиналан допринос науци, будући да на један
33 свеобухватан начин говори о порисуству норовируса у дагњама, тренутно
34 најактуелнијим патогенима преносивим храном. Резултати испитивања приказани у
35 оквиру ове докторске дисертације пружају податке о присуству и молекуларним
36 карактеристикама генома норовируса идентификованих у дагњама на нашем тржишту,
37 а са подручја Црне Горе, а који до сада нису били доступни научној јавности. По први
38 пут је добијен увид о присуству норовируса у дагњама са нашег тржишта.
39 Упоређивањем нуклеотидних секвенци вируса детектованих у овој дисертацији са
40 аналогним нуклеотидним секвенцама сојева норовируса до сада описаних у свету,
41 добијен је увид у њихову међусобну сличност.

42
43 **IX ПРЕДЛОГ:**

44
45 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
46 **три понуђених могућности):**

47 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 ДАТУМ
59 08.08.2017.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Др Мирјана Димитријевић, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Бранко Велебит, виши научни сарадник,
Институт за хигијену и технологију меса
Београд

Др Владо Теодоровић, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Неђељко Карабасил, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Дејан Видановић, научни сарадник,
Ветеринарски специјалистички институт
„Краљево“
