

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

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

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

10
11 Наставно научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду,
12 285. седница одржана 08. 07. 2026. године

13
14 **2. Састав комисије са назнаком 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 **Напомена:** редослед чланова Комисије је такав да се прво наводе наставници са ФВМ а затим чланови
18 из других институција, сем у случају када је ментор дисертације из друге институције. Тада се ментор из
19 друге институције уписује под редним бројем 2, односно после ментора са ФВМ који је под редним бројем
20 1.

21
22 1. Др Наташа Стевић, ванредни професор, Епизоотиологија, заразне болести
23 животиња и болести пчела и свилопреља, 2026. година, Факултет ветеринарске
24 медицине Универзитета у Београду, председник комисије

25
26 2. Др Дејан Крњаић, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2016.
27 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

28
29 3. Др Душан Миливојевић, виши научни сарадник, Молекуларна биологија,
30 микробиологија, 2024. година, Институт за молекуларну генетику и генетичко
31 инжењерство, Универзитет у Београду

32
33 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

34
35 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

36
37 Зорана, Ацо, Зуровац Сапунцић

38
39 **2. Датум рођења, општина, Република:**

40
41 29. 06. 1991., Сарајево, Центар, Република Босна и Херцеговина

42
43 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**

44
45 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

46
47 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

48
49 „Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији
50 Републике Србије“.

51
52
53 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести број страна, поглавља, слика,**
54 **шема, графикана и сл.):**

55
56 Докторска дисертација кандидаткиње Зоране Зуровац Сапунцић је написана на укупно
57 87 страна компјутерски обрађеног текста и садржи следећа поглавља: Увод (2 стране),
58 Преглед литературе (19 страна), Циљеви и задаци (1 страна), Материјал и методе (16
59 страна), Резултати (18 страна), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране), Литература
60 (17 страна) и Прилог 1 (1 страна). На почетку се налази кратак садржај на српском и

енглеском језику, као и садржај докторске дисертације. Рад је документован са 24 табеле (1 табела у поглављу Преглед литературе, 6 табела у поглављу Материјал и методе и 17 табела у поглављу Резултати) и 13 слика (2 слике у поглављу Преглед литературе, 1 слика у поглављу Циљ и задаци и 10 слика у поглављу Резултати). Списак литературе чине 164 библиографске јединице од којих је најстарија публикована 1897. године, а најновија 2025. године.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до 500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка референци-навести број референци у докторској дисертацији):

У поглављу **Увод**, докторанткиња наводи да бруцелоза на глобалном нивоу, представља једну од најраспрострањенијих зооноза, која из угла епизоотиологије и епидемиологије не губи на актуелности. Имајући у виду све динамичније промене животне средине које настају као последица урбанизације и глобализације, учесталије је и преклапање простора у коме бораве домаће и дивље животиње. Блиски, чести контакти доводе до пораста ризика и повећања шанси за ефикасне контакте и пренос патогена са дивљих на домаће животиње и обрнуто. Наглашавајући значај концепта *Једног здравља*, кандидаткиња истиче и један од његових основних циљева: заштиту јавног здравља кроз разумевање и контролу зооноза у циљу спречавања или смањења њиховог преноса на људе. Као болест која је обавезна за пријављивање на међународном нивоу, бруцелоза свих врста домаћих животиња подразумева примену ерадикационих програма који се спроводе широм света. Ефективност контроле и у крајњој линији програми искорењивања, директно зависе од реалне ситуације на терену не само код домаћих већ и дивљих животиња. У Србији, бруцелоза се код домаћих животиња јавља спорадично, а сталне контроле су значајно смањиле њену преваленцију. Треба нагласити да без обзира на низак зоонозни потенцијал, бруцелоза дивљих свиња представља озбиљан изазов за сточарску производњу, с обзиром на то да је ова врста често асимптоматски носилац *Brucella suis* биотипа 2, те да постоји могућност преноса инфекције не само на домаће свиње већ и друге осетљиве врсте које се узгајају екстензивно. На основу доступних података из литературе, закључује се да ова докторска дисертација представља прво испитивање бруцелозе код дивљих свиња у нашој земљи.

У поглављу **Преглед литературе** описани су сви значајни аспекти бруцелозе, укључујући сам род бруцела и посебно врсте *Brucella suis*. Бруцеле су грам негативне факултативно интрацелуларне бактерије, у чијем одржавању најважнију улогу имају примарни домаћини, код којих болест може да протиче асимптоматски, најчешће изазивајући побачаје и промене на гениталним органима. Свиње су примарни домаћини за три од укупно пет биотипова *Brucella suis*. Инфекције изазване биотиповима 1 и 3 разликују се од оне изазване биотипом 2 у погледу домаћина и географске дистрибуције. Биотипови 1 и 3 карактеристични су за домаће, а биотип 2 за дивље свиње и европског зеца (*Lepus europaeus*). Докторанткиња наглашава да биотипови 1 и 3 изазивају тешку клиничку слику код људи, док биотип 2 има низак зоонозни потенцијал. Болест се код људи ретко дијагностикује, а до сада највећи број инфицираних особа је регистрован у Француској и везан је за контакт ловаца са дивљим свињама. Имајући у виду широку географску распрострањеност биотипа 2 *Brucella suis*, претпоставља се да је стварна учесталост инфекције код људи већа од званично регистрованих случајева, због честог изостанка идентификације врсте и биотипа бруцела. Даље, наводи се географска дистрибуција и епизоотиологија бруцелозе код дивљих свиња, патогенеза, клиничка слика и патоморфолошке промене. У **Прегледу литературе** се истиче да дијагностика бруцелозе представља основ за ефикасно праћење и контролу болести, а правовремено откривање инфицираних животиња омогућава идентификацију извора инфекције и процену ризика од ширења болести у популацијама дивљих и домаћих животиња. Дијагностички приступ је вишестепен и заснива се на комбинацији епизоотиолошких метода испитивања, серолошких тестова, изолације узрочника и савремених молекуларних метода, при чему свака од наведених има своје предности, ограничења и специфичну примену у

1 пракси. У делу Серолошка дијагностика бруцелозе у складу са препорукама Светске
2 организације за здравље животиња (World Organisation for Animal Health, WOAH),
3 побројани су најчешће коришћени тестови: брза серумска аглутинација (RBT), реакција
4 везивања комплемента (RVK), тест флуоресцентне поларизације (FP) и имуноензимски
5 тест (ELISA). Докторанткиња наглашава и важност двостепеног приступа у серолошкој
6 дијагностици који подразумева иницијално коришћење брзих, осетљивих, тријажних
7 тестова, након чега се резултати потврђују тестовима високе специфичности. И поред
8 тога што се у пракси најчешће користи серолошка дијагностика, бактериолошка
9 изолација и идентификација бруцела и даље има кључну улогу у потврди болести. Уз
10 то, наглашава се да је успешна изолација бактерија условљена бројним факторима од
11 којих је најважнији квалитет узорка, имајући у виду спор раст бруцела у
12 лабораторијским условима, често мали број бруцела у ткивима хронично инфицираних
13 јединки, као и потребу за добро обученим кадром и строго контролисаним условима
14 рада. Контаминација материјала пореклом од дивљих свиња до које долази приликом
15 узорковања, кључни је фактор који омета изолацију бруцела. Наглашавајући све већу
16 употребу молекуларних тестова у дијагностици инфективних болести уопште,
17 докторанткиња наглашава значај одабира протокола екстракције ДНК бруцела из
18 клиничког материјала. Иако се молекуларна дијагностика одликује добрим
19 дијагностичким перформансама, њена осетљивост може у значајној мери да буде
20 смањена присуством супстанци које инхибирају амплификацију ДНК. На крају прегледа
21 литературе, истакнут је и значај дивљих свиња у Републици Србији и њихова улога у
22 концепту *Једног здравља*.

23 **Циљ истраживања** ове докторске дисертације је да се утврди присуство и раширеност
24 врста *Brucella* и биотипова као и да се установи постојање серолошког одговора у
25 популацији дивљих свиња на територији Републике Србије. Уз то, молекуларним
26 методама било је потребно извршити карактеризацију изолата *Brucella spp.*,
27 дефинисати најповољнији протокол за екстракцију ДНК бруцела и проценити валидност
28 употребљених серолошких тестова у дијагностици бруцелозе код дивљих свиња. У
29 складу са постављеним циљевима дефинисани су следећи задаци:

- 30 1. Прикупљање крви и органа дивљих свиња;
- 31 2. Обрада узорка за испитивање: одвајање крвног серума, хомогенизација
32 органа, паковање и одлагање узорка до даље обраде;
- 33 3. Серолошко испитивање крвних серума RBT и cELISA тестом;
- 34 4. Бактериолошко испитивање - изолација *Brucella spp.* из прикупљених узорка на
35 бифазном Кастанеда медијуму;
- 36 5. Молекуларно испитивање изолата Bruce-ladder multiplex PCR тестом;
- 37 6. Секвенцирање генома и генотипизација изолата *Brucella spp.*;
- 38 7. Екстракција бактеријске ДНК из узорка дивљих свиња са три различита
39 протокола;
- 40 8. Молекуларно испитивање ДНК екстраховане са три различита протокола
41 методом real-time PCR у циљу доказивања присуства генома *Brucella spp.*;
- 42 9. Статистичка обрада резултата и процена погодности и валидности примењених
43 серолошких тестова у дијагностици бруцелозе дивљих свиња;
- 44 10. Дефинисање најповољнијег протокола за екстракцију ДНК *Brucella spp.* из ткива;
- 45 11. Процена свеукупне епизоотиолошке ситуације са дефинисањем ризичних
46 подручја.

47 На крају овог поглавља приказан је и дијаграм тока испитивања ради лакше
48 прегледности.

49 У поглављу **Материјал и методе** докторанткиња је јасно и детаљно описала начин
50 прикупљања, обраду материјала, као и све примењене методе испитивања. За потребе
51 истраживања прикупљен је материјал који је обухватао крв и органе дивљих свиња
52 одстрелених током ловних сезона у периоду 2020-2022. године. Истраживање је
53 одобрено од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња при
54 Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду (Мишљење број 26/2021).
55 Крв дивљих свиња за серолошка испитивања сакупљена је у оквиру мониторинга на
56 класичну и афричку кугу свиња (у складу са Правилником о утврђивању Програма мера
57 здравствене заштите животиња Министарства пољопривреде, шумарства и
58 водопривреде) током ловних сезона 2020-2021. и 2021-2022. године. Узорци крви
59 потицали су од јединки са територије шест управних округа Србије: Браничевског,
60 Борског, Јужнобанатског, Зајечарског, Поморавског и Шумадијског. Након одстрела, крв

1 је узоркована из срца или грудне шупљине помоћу шприца и игле у стерилне епрувете
2 са активатором коагулације, које су након обележавања транспортоване у Научни
3 институт за ветеринарство Србије ради даље обраде. Укупно је сакупљено 480 узорак
4 крви, 176 од крмача и 304 од вепрова.

5 За изолацију *Brucella* spp. и молекуларна испитивања прикупљени су органи и крв од
6 дивљих свиња одстрелених у оквиру мониторинга на класичну и афричку кугу свиња
7 током исте ловне сезоне 2021-2022. године са територије шест управних округа Србије
8 и то: Јужнобанатског, Зајечарског, Борског, Шумадијског, Београдског и Колубарског.
9 Органи су паковани појединачно у стерилне биохазард кесе, а крв узоркована из срца
10 или грудне шупљине у стерилне епрувете запремине 10 ml. За сваки узорак попуњен је
11 образац (Прилог 1 који се налази на крају докторске дисертације) са подацима о
12 одстреленој јединки (пол, старост) и месту улова (гео координате), након чега су
13 узорци транспортовани у Научни институт за ветеринарство Србије, ради даље обраде.
14 Од укупно 85 дивљих свиња (82 вепра и 3 крмаче) прикупљено је 114 узорак,
15 укључујући тестисе са епидидимисима, цервикалне лимфне чворове, материцу,
16 тонзиле и крв.

17 Поред наведених узорак, у испитивање је укључено и 200 узорак слезина
18 прикупљених током исте ловне сезоне (2021-2022. год.) и са територија истих управних
19 округа. Од ових животиња једино су били доступни узорци слезина, док други органи и
20 крв нису били расположиви за анализу. Узорци слезина испитани су методом real-time
21 PCR за утврђивање генома *Brucella* spp., према протоколу описаном у поглављу
22 Молекуларна дијагностика: real-time PCR, при чему су формиран збирни узорци од по
23 три слезине. У случајевима када је у збирним узорцима добијен позитиван резултат,
24 вршена је идентификација појединачних узорак који су показали позитиван налаз.
25 Слезине пореклом од два вепра, у којима је у појединачном real-time PCR испитивању
26 утврђена позитивна реакција, издвојене су за даља бактериолошка и молекуларна
27 испитивања. На овај начин, за бактериолошка испитивања укупно је прикупљено и
28 испитано 116 узорак пореклом од 87 дивљих свиња.

29 С обзиром на то да због недоступности или лошег квалитета узорак крви није било
30 могуће добити одговарајући узорак крвног серума од свих 87 дивљих свиња, сакупљено
31 је 48 крвних серума, који су урачунати у укупан број испитаних крвних серума
32 (материјал за серолошка испитивања).

33 Највише узоркованих вепрова било је старије од 2,5 године (35 јединки), док је у
34 категорији старости 1,5-2,5 године узорковано њих 28, а у групи 6-18 месеци 21 јединка.
35 Све узорковане крмаче (n=3) биле су старије од 2,5 године.

36 За серолошка испитивања 480 крвних серума дивљих свиња коришћена су два теста.
37 Иницијално су сви серуми прегледани тријажним Rose Bengal тестом, а потом су узорци
38 који су реаговали позитивно испитани потврдним cELISA тестом. Узорци су сматрани
39 позитивним само ако су у оба теста дали позитивну реакцију. За извођење брзог
40 аглутинационог теста (RBT) коришћен је комерцијално доступни антиген (Rose Bengal,
41 ID vet, Francuska), а за извођење cELISA комерцијални кит SVANOVIR® *Brucella*-Ab C-
42 ELISA (Svanova, Шведска).

43 За изолацију бактерија коришћен је бифазни Кастанеда медијум припреман од
44 триптозног агара (Tryptone Soya Agar, Oxoid, UK), уз додатак селективног суплемента
45 (*Brucella* Selective Supplement, Oxoid, UK), 10% коњског серума (Horse Serum, Capricorn
46 Scientific, Немачка) и 5% декстрозе. Након хлађења агара у боце је наливан триптозни
47 бујон, у који је претходно додат исти селективни додатак, коњски серум и декстроза.
48 Након провере стерилности подлога, у боце је наливан 1 мл ткивног хомогенизата
49 односно крви. Засејане подлоге инкубирале су на температури од 37 °C у аеробним
50 условима током 10 дана. Уколико након овог периода није дошло до раста специфичних
51 колонија, инкубација је прекидана. Укупно је засејано 116 узорак (тестиси са
52 епидидимисима, материца, цервикални лимфни чвор, тонзиле, слезина, крв) пореклом
53 од 87 дивљих свиња. Колоније које су морфолошки одговарале бруцелама (округле,
54 ситне, глатке, сјајне, провидне) бојене су по Граму, док су изолати чије су
55 карактеристике биле типичне за род (црвени грам негативни кокобацили) даље
56 анализирани Bruce-ladder multiplex PCR реакцијом. За екстракцију ДНК из бактеријских
57 култура коришћен је комерцијални кит IndiSpin® Pathogen Kit (Indical Bioscience,
58 Немачка). Након завршених метода изолације и молекуларне идентификације на
59 Катедри за заразне болести животиња и болести пчела Факултета ветеринарске
60 медицине Универзитета у Београду, изолат је прослеђен лабораторији НИВ Србија.

За потребе секвенцирања izolata идентификованог као *B. suis* изведен је конвенционални PCR применом пражмера описаних од стране Leal-Klevezas i sar. (1995), а производи специфичне дужине су пречишћени коришћењем QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Немачка). Пречишћени PCR производ послат је на секвенцирање Sanger методом у комерцијални сервис MacroGen Europe (Amsterdam, Холандија), а обрађене секвенце депоноване су у NCBI GenBank (PP785990.1). У циљу утврђивања генетичке сличности и процене еволутивне стабилности izolata *B. suis* биотип 2 на територији Србије, извршена је компаративна анализа нуклеотидних секвенци између izolata названог ZZS1 и izolata *B. suis* биотип 2 из 2013. године (GenBank: KT309077.1), који је коришћен као референтни. Анализа је спроведена применом алата BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) у оквиру Националног центра за биотехнолошке информације (NCBI GenBank, Maryland, SAD). Коришћен је алгоритам за упоредно поравнање парова секвенци (Pairwise Sequence Alignment) ради идентификације процената нуклеотидне идентичности (Identities), присуства празнина (Gaps) и статистичког значаја подударности (E-value). Фокус анализе био је на високо конзервираном региону инсерционе секвенце.

Екстрахована бактеријска ДНК послата је и на секвенцирање целог генома (WGS) у Лабораторију за бактеријске зоозоозе и молекуларну дијагностику бактеријских болести при Европској референтној лабораторији за бруцелозу (EURL за бруцелозу), ANSES, Maisons-Alfort, у Француској. Секвенцирање је извршено на Illumina платформи, а биоинформатичка обрада сирових података спроведена је према протоколу LSA-INS-SB_1 (Anses – EU Reference laboratory for Brucellosis, Maisons-Alfort, Cedex, France). Критеријум за високи квалитет читавања (*High-Quality*, HQ) постављен је на праг од $\geq 80\%$.

Таксономска идентификација и процена дубине покривености вршене су у односу на референтне геноме рода *Brucella*. Минимални критеријуми за даљу филогенетску анализу били су покривеност генома $\geq 90\%$ и просечна дубина читања (методолошки праг) (*depth/dubina*) $\geq 50\times$.

Таксономска припадност izolata ZZS1 анализирана је применом *in silico* алата за типизацију на нивоу целог генома. Идентификација врсте извршена је поређењем асемблиране секвенце са панелом репрезентативних генома рода *Brucella*, при чему су као кључни параметри коришћени филогенетска сродност и подударност са изолатима *B. suis* биотипа 2 депонованим у базама података.

Ради потврде таксономске припадности на нивоу рода, конструисано је филогенетско стабло које обухвата репрезентативне геноме различитих врста рода *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* итд.). Стабло је генерисано на основу сличности целих геномских секвенци (whole-genome alignment) и конструисано методом максималне веродостојности (*Maximum Likelihood*). Као корен стабла (*outgroup*) коришћен је референтни геном *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1). Визуелизација и финална обрада извршена је помоћу алата iTOL (Interactive Tree Of Life), уз интеграцију метаподатака о географском пореклу и домаћинима референтних сојева из панела.

Генотипизација izolata извршена је мултилокусном типизацијом секвенци (MLST-9) анализом девет локуса: седам стандардних "housekeeping" гена (*gap*, *aroA*, *glk*, *dnaK*, *gyrB*, *trpE*, *cobQ*) и два додатна маркера (*int_hyp* и *omp25*).

У циљу постизања веће епизоотиолошке резолуције, спроведена је и анализа тандемских понављања варијабилног броја на више локуса (MLVA-16). Метода је обухватила 16 варијабилних локуса подељених у три панела: Панел 1 (осам локуса за идентификацију врсте), Панел 2А и Панел 2Б (укупно осам локуса за фину дискриминацију унутар врсте).

Екстракција ДНК из узорка дивљих свиња применом три протокола обухватила је: употребу комерцијалног кита за екстракцију, протокол са гуанидин-изотиоцијанатом (комерцијални назив TRIzol™ Reagent) и протокол са грејањем и хлађењем у течном азоту.

Узорци нуклеинских киселина, екстраховани помоћу три различита протокола, коришћени су за извођење real-time PCR. Реакција је извођена на апарату real-time PCR system 7300, Applied Biosystems (SAD). За извођење реакције коришћен је комерцијални кит Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (BioLabs, SAD), PCR чиста вода (Thermo Fisher Scientific, SAD) и пражмери за циљну секвенцу IS711, описани од стране Hinić i sar. (2008).

За статистичке анализе коришћен је софтверски пакет IBM SPSS v. 26.0.0.0, XLSTAT Version 2014.503. i OpenEpi Version 3 (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

Разлике у учесталости серопреваленције старосних категорија и пола утврђене су применом Hi-kvadrat testa, односно Фишеровог егзактног теста, уколико је очекивана фреквенција по дефинисаној групи била испод 10. Одређен је и релативни ризик, као вероватноћа појаве бруцелозе у изложеној старосној групи у односу на неизложену старосну групу, кроз однос разлика у инциденцији бруцелозе, уз дефинисање разлика у ризику од појаве бруцелозе између различитих старосних група. Wilsonovim методом одређен је 95% интервал поверења (IP).

Дијагностички параметри примењених серолошких тестова, RBT и cELISA теста, обухватали су одређивање осетљивости, специфичности, позитивне и негативне предиктивне вредности, као и односа позитивне и негативне вероватноће. Cohenov карра тест је коришћен за утврђивање усаглашености два примењена серолошка теста. Вредности карра коефицијента у датим распонима су указивали на следећи ниво усаглашености: 0,0-0,20 – слаба усаглашеност; 0,21-0,40 – блага усаглашеност; 0,41-0,60 – умерена усаглашеност; 0,61-0,80 – значајна усаглашеност и 0,81-1,00 – скоро потпуна усаглашеност.

Бинарна логистичка регресија је употребљена како би се утврдила вероватноћа појаве бруцелозе, односно развоја сероконверзије код различитих старосних категорија, као и пола испитаних дивљих свиња. Како пол није имао утицаја на појаву бруцелозе, старост, као независна категоријска варијабла је приказана кроз финални логистички модел, уз дефинисање односа вероватноће (OV) i 95% IP.

Поглавље **Резултати** подељено је на одвојене целине, у складу са постављеним задацима и описаним методама испитивања.

Резултати серолошких испитивања су показали да је од 480 прегледаних крвних серума дивљих свиња, сероконверзија против узročника бруцелозе утврђена код 45 јединки. Укупна серопреваленција бруцелозе код дивљих свиња на територији Србије износи 9,38% (95% IP: 7,08-12,31). Највећа серопреваленција регистрована је у Поморавском округу током 2021. године и износила је 25%, односно 21,88% током 2020. године. Следе Браничевски, Борски и Јужнобанатски округ са серопреваленцијом код дивљих свиња од 12,64%, 7,69% и 6,47%. У Зајечарском и Шумадијском округу није доказана сероконверзија код испитаних дивљих свиња. Резултати серолошких испитивања дивљих свиња према старосним категоријама и полу, уз процену ризика од појаве бруцелозе показали су да је највећи број испитаних дивљих свиња припадао категорији 6-18 месеци старости (n=223, 46,5%). У категорији 0-6 месеци старости испитано је 11 јединки (2,2%), у категорији 1,5-2,5 године 154 (32,1%), док су 92 испитане дивље свиње (19,1%) биле старије од 2,5 године. Највиша серопреваленција бруцелозе детектована је у старосној категорији дивљих свиња млађих од 6 месеци (27,27%, n=3), али је ова категорија због карактеристика болести искључена из даљих анализа. У категорији 1,5-2,5 год серопреваленција бруцелозе код дивљих свиња износи 14,94% (n=23), а код јединки старих 6-18 месеци 6,28% (n=14). Најнижа серопреваленција бруцелозе од 5,43% утврђена је код дивљих свиња старијих од 2,5 године (n=5). Фишеровим егзактним тестом утврђена је статистички значајна разлика између старосних група дивљих свиња и серопреваленције бруцелозе (p=0,0038). Дивље свиње старости 6–18 месеци показују готово исту учесталост сероконверзије као јединке старије од 2,5 године (релативни ризик 1,07). Дивље свиње старости 1,5–2,5 године издвајају се као најризичнија група, са 2,75 пута већим релативним ризиком од сероконверзије у односу на старије и 2,56 пута у односу на млађе јединке. Ови налази су потврђени анализом разлика у ризику, која је показала да јединке старости 1,5–2,5 године имају статистички значајно већи ризик од сероконверзије у поређењу са јединкама 6–18 месеци старости (9,11%, p=0,0031) и са старијима од 2,5 године (9,50%, p=0,0235). Разлика између најмлађих и најстаријих дивљих свиња није била статистички значајна (0,39%, p=0,0891). Бинарном логистичком регресијом потврђено је да дивље свиње старости 1,5–2,5 године имају већу вероватноћу инфекције у поређењу са најмлађом групом (B>0), док поређење са јединкама старијим од 2,5 године није било статистички значајно (B<0). Вероватноћа инфекције код јединки старости 1,5–2,5 године је 2,61 пута већа у односу на јединке старости 6–18 месеци. Уз то, установљено је да нема статистички значајне разлике између пола животиње ($\chi^2=0,8462$, p=0,358), те да он не представља фактор ризика. У оквиру испитивања погодности серолошких тестова за дијагностику бруцелозе код дивљих свиња, статистичком обрадом добијених резултата,

а на основу дијагностичких перформанси теста (осетљивост и специфичност), утврђено је да RBT тачно класификује 98,96%, а погрешно 1,04% испитаних узорака. Статистичком обрадом добијених резултата, а на основу дијагностичких перформанси теста (осетљивост и специфичност) пријављених од стране произвођача, cELISA класификује тачно 99,58%, односно погрешно 0,42% испитаних узорака. Поређење резултата добијених cELISA и RBT, уз коефицијент Cohеновог карпа теста од 0,94 ($SE=0,026$; $p=0,0001$), указује на готово савршену усаглашеност између два примењена теста. Ови резултати потврђују да и cELISA и RBT показују висок степен подударности у детекцији специфичних антитела против узрочника бруцелозе код дивљих свиња, уз минималан број неподударајућих резултата.

У циљу изолације узрочника бруцелозе из узорака дивљих свиња укупно је засејано 116 узорака пореклом од дивљих свиња, а изолација бруцела била је успешна код једног вепра из два узорка: цервикалног лимфног чвора и крви. Заражени вепар, старости 15-18 месеци потиче са територије Јужнобанатског округа. У циљу прецизне идентификације изолата урађен је Bruce-ladder multiplex PCR. Испитивани изолат показао је седам ампликона дужина 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 и 152 bp, што одговара типичном обрасцу за *B. suis*. Кључни фрагмент од 272 bp појављује се и код *B. canis*, што је препознато као један од главних недостатака методе. Ипак, одсуство 794-bp фрагмента код *B. canis* омогућава диференцијацију између ове две врсте.

У циљу секвенцирања изолата *B. suis* и генске анализе, нуклеинска киселина изолата идентификованог као *B. suis* применом Bruce-ladder multipleks реакције, умножена је прајмерима специфичним за *Brucella* spp. (конвенционални PCR), при чему је добијен продукт дужине 456 bp, који је секвенциран Sanger методом. Идентификовани регион обухвата IS5-слични елемент, транспозазу из фамилије IC711 и гене који кодирају YdcH протеине. Очитане секвенце изолата ZZS1 су депоноване у NCBI GenBank са приступним бројем PP785990.1 Компаративном анализом нуклеотидних секвенци применом BLASTn алата утврђен је висок степен генетичке подударности између ZZS1 (GenBank: PP785990.1) и *B. suis* биотип 2 изолованог код домаћих свиња у Србији (KT309077.1). Иако су секвенце добијене циљањем различитих сегмената генома (456 bp наспрам 774 bp), идентификован је заједнички преклапајући регион (*overlapping region*) од 94 bp унутар високо конзервиране инсерционе секвенце IS711 која кодира транспозазу. У овом специфичном сегменту утврђена је нуклеотидна идентичност од 98% (92/94 bp), уз минималне геномске варијације (Gaps: 2%), што уз веома ниску Е-вредност (7e-44) искључује могућност случајног подударања.

Секвенцирање целог генома (WGS) вршено је на Illumina платформи у Европској референтној лабораторији за бруцелозу. Анализом нуклеинске киселине изолата 33C1 генерисано је укупно 1.102.555 читавања, од којих је 96,4% задовољило критеријуме квалитета, а контаминација није детектована.

Потврђено је да изолат припада врсти *B. suis* биотип 2. Анализа је показала потпуну покривеност референтног генома од 100%, уз просечну дубину читања од 96x, што је значајно изнад постављеног методолошког прага.

De novo асемблирањем добијено је 30 контига, укупне величине 3.303.279 bp. Измерена N50 вредност износила је 276.874 bp, што указује на висок степен континуитета и низак ниво фрагментације асемблираног генома. Висока N50 вредност (скоро 277 kb) значи да су „делови“ генома (kontizi) дугачки и информативни.

Таксономска идентификација и *in silico* типизација на нивоу рода потврдила је прецизну таксономску позицију изолата ZZS1. На генерисаном стаблу, ZZS1 је јасно кластровао унутар гране резервисане за *B. suis*, показујући највећу сродност са референтним панелом биотипа 2 (sojevi 92-63 и Thompson). Потпуна одвојеност од грана које формирају *B. abortus* и *B. melitensis* додатно потврђује таксономску чистоћу изолата и искључила је могућност погрешне идентификације.

Анализом полиморфизама појединачних нуклеотида (SNP) и филогеније на нивоу соја, установљено је да је изолат ZZS1 позициониран у оквиру гране која обухвата сојеве *B. suis* биотипа 2 изолованих код дивљих, али и домаћих свиња у Хрватској (CVI_196) и Немачкој (сојеви F7-06-1 и F7-06-2), што потврђује циркулацију овог генотипа у популацијама дивље фауне у региону. Филогенетски положај изолата ZZS1 добијен је на основу геномских секвенци *B. suis* које су биле доступне у NCBI GenBank бази података у време спровођења анализе (фебруар 2026. године). Након ажурирања базе података у мају 2026. године и додавања нових геномских секвенци *B. suis*, извршена је нова филогенетска анализа, при чему је прецизније дефинисан филогенетски положај

1 изолата ZZS1, при чему је утврђено да му је најсроднији изолат пореклом из дивљих и
2 домаћих свиња из Немачке (сој F7-06-2).

3 Мултилокусна типизација секвенци (MLST-9) изолата ZZS1 показала је да он припада
4 секвенционом типу ST16, уз следећи алелни профил за девет анализираних
5 локуса: *gap* (4), *agoA* (2), *glk* (7), *dnaK* (1), *gyrB* (3), *trpE* (3), *cobQ* (5), *int_hyp* (3)
6 и *omp25* (2). Овај профил је идентичан профили референтних сојева *B. suis* биотип 2.
7 Укључивање маркер локуса *int_hyp* (алел 3) и *omp25* (алел 2) у анализу додатно је
8 учврстило идентификацију изолата ZZS1 као ST16. Посебно је значајан алел 2 на
9 гену *omp25*, који је типичан маркер за *B. suis* биотип 2.

10 Анализом тандемских понављања варијабилног броја на више локуса (MLVA-16)
11 утврђен је специфичан нумерички профил варијабилних локуса изолата ZZS1. Кључне
12 вредности за панеле биле су: *Bruce06* (2), *Bruce08* (5), *Bruce11* (8), *Bruce12* (14), уз
13 вредности на осталим локусима (*Bruce 42, 43, 45, 55, 18, 19, 21, 04, 07, 09, 16, 30*), уз
14 напомену да вредности на *Bruce42* и *Bruce55* нису очитане. Овај профил показује највиши
15 степен генетичке сродности са европским изолатима из дивљих свиња.

16 Резултати добијени екстракцијом ДНК са три различита протокола комерцијалним
17 китом и применом два лабораторијски развијена протокола нису били статистички
18 значајни (χ^2 : $p=0,89$). Екстракција ДНК применом комерцијалног кита (ПЕ1) и
19 протокола са грејањем и хлађењем у течном азоту (ПЕ3) дала је позитиван *Brucella* spp.
20 real-time PCR резултат за 16 идентичних узорак, док је употреба TRIzol™ реагенса у
21 екстракцији ДНК из узорак дивљих свиња (ПЕ2) резултирала са 14 real-time PCR
22 позитивних реакција. Свих четрнаест real-time PCR позитивних узорак за геном
23 *Brucella* spp. након екстракције ДНК са TRIzol™ реагенсом (ПЕ2), било је позитивно и са
24 преостала два примењена протокола екстракције. Односно, екстракција ДНК бруцела
25 са TRIzol™ реагенсом, у поређењу са комерцијалним китом и протоколом са грејањем и
26 хлађењем у течном азоту, није била успешна из два узорка (слезине и тестиса са
27 епидидимисима).

28 Од укупно испитаних 116 узорак пореклом од дивљих свиња присуство генома *Brucella*
29 spp. методом real-time PCR је утврђено у укупно 16 узорак.

30 Присуство генома *Brucella* spp. утврђено је у 8 узорак (17,02%, 95% IP: 8,90-29,10)
31 пореклом од дивљих свиња из Јужнобанатског округа. У Борском и Зајечарском округу
32 геном *Brucella* spp. утврђен је у по 4 узорка пореклом од дивљих свиња, при чему је
33 учесталост позитивних налаза износила 21,05% (95% IP: 8,51-43,33), односно 15,38%
34 (95% IP: 6,17-33,53). Код дивљих свиња са подручја Београдског, Колубарског и
35 Шумадијског округа није утврђено присуство генома *Brucella* spp.

36 Геном *Brucella* spp. је у највећем броју детектован у узорцима тестиса и епидидимиса
37 ($n=9$). Присуство генома потврђено је и у по два узорка крви, цервикалног лимфног
38 чвора и слезине, као и у једном узорку тонзила.

39 Геном *Brucella* spp. детектован је у крви и лимфном чвору дивљег вепра, из којих је
40 изолована *B. suis* биотип 2. У тестисима и епидидимисима исте јединке геном није
41 утврђен. Поред наведеног случаја, геном *Brucella* spp. детектован је и код још 14
42 дивљих свиња, тако да је укупан број позитивних јединки износио 15 од укупно 87
43 испитаних дивљих свиња. На основу тога, преваленција присуства генома *Brucella* spp.
44 у испитиваној популацији износи 17,24% (95% IP: 9,1–25,4).

45 У поглављу **Дискусија** докторанткиња упоређује добијене резултате са резултатима
46 других аутора, критички их анализира, правилно цитирајући податке из доступне
47 литературе. У **Поглављу Литература**, правилно се наводи и у тексту цитира 164 добро
48 одабране референце.

49 VI ЗАКЉУЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској 50 дисертацији):

51
52 На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

- 54 1. У популацији дивљих свиња на територији Републике Србије бруцелоза је
55 утврђена применом серолошких, бактериолошких и молекуларних метода
56 дијагностике.
- 57 2. Утврђена серопреваленција бруцелозе код дивљих свиња износи 9,38% (95%
58 IP: 7,08-12,31). Највиша серопреваленција забележена је у Поморавском округу
59 износећи 22,73% (95% IP: 12,84-36,99), док је у Браничевском, Борском и
60 Јужнобанатском округу утврђена серопреваленција од 12,64% (95% IP: 8,57-

- 18,25), 7,69% (95% IP: 2,65-20,32) и 6,47% (95% IP: 3,44-11,85). У Зајечарском и Шумадијском округу није доказана сероконверзија ни код једне испитане дивље свиње.
3. Старост дивљих свиња представља значајан фактор ризика за сероконверзију ($p=0,0038$). Дивље свиње старости 1,5–2,5 године издвојиле су се као најризичнија категорија, са 2,75 пута већим релативним ризиком од сероконверзије у односу на старије јединке и 2,56 пута већим ризиком у односу на млађе. Јединке старости од 6 до 18 месеци показале су готово исту учесталост сероконверзије као јединке старије од 2,5 године ($RR=1,07$). Анализа разлика у ризику показала је да дивље свиње старости 1,5–2,5 године имају статистички значајно већи ризик од сероконверзије у поређењу са јединкама 6–18 месеци старости (9,11%, $p=0,0031$), као и у поређењу са јединкама старијим од 2,5 године (9,50%, $p=0,0235$).
 4. Пол дивљих свиња није утврђен као статистички значајан фактор ризика за инфекцију ($\chi^2=0,8462$, $p=0,358$).
 5. Применом серолошких тестова RBT и cELISA утврђена је готово савршена усаглашеност резултата (Коепов карпа коефицијент 0,94, $SE=0,026$; $p=0,0001$), што указује на високу поузданост и погодност за дијагностику бруцелозе код дивљих свиња.
 6. На основу добијених резултата испитивања закључује се да је *Brucella suis* биотип 2 узročник бруцелозе код дивљих свиња у Републици Србији. Овај патоген изолован је из крви и цервикалног лимфног чвора дивљег вепра старости 15-18 месеци, пореклом из Јужнобанатског округа.
 7. Секвенцирањем целог генома изолата *B. suis* биотип 2 и спроведеном филогенетском анализом утврђена је највећа генска сродност са референтним сојевима биотипа 2 (92-63 i Thomsen). SNP анализом потврђена је блиска сродност са изолатима пореклом из Немачке, док је MLST-9 анализом утврђена припадност секвенционом типу ST16. Специфичан нумерички профил варијабилних локуса изолата *B. suis* биотип 2 указује на генетичку сродност са изолатима пореклом од дивљих свиња са територије Европе.
 8. Поређењем резултата real-time PCR анализе након екстракције ДНК бруцела из узорак дивљих свиња применом три различита протокола, није утврђена статистички значајна разлика ($p=0,89$). Узимајући у обзир све предности примене, комерцијални кит показао се најпогоднијим за екстракцију ДНК бруцела, у поређењу са протоколима заснованим на примени гванидин-изотиоцијаната (TRIzol™ reagents) и грејањем и хлађењем у течном азоту.
 9. Геном *Brucella* spp. утврђен је код 17,24% (95% IP: 9,1-25,4) испитаних дивљих свиња. По окрузима, геном *Brucella* spp. утврђен је у 17,02% (95% IP: 8,90-29,10) узорак дивљих свиња из Јужнобанатског, 21,05% (95% IP: 8,51-43,33) из Борског и 15,38% (95% IP: 6,17-33,53) из Зајечарског округа. У узорцима дивљих свиња са подручја Београдског, Колубарског и Шумадијског округа није доказано присуство генома *Brucella* spp.
 10. Геном *Brucella* spp. је најчешће детектован у тестисима и епидидимисима, док је ређе потврђен у крви, цервикалним лимфним чворовима, слезини и тонзилама. Оваква дистрибуција указује на изражен тропизам узročника према репродуктивним органима, уз могућу системску дисеминацију и присуство у лимфоретикуларним ткивима.
 11. Резултати ове дисертације представљају основу за будућа истраживања усмерена на даље разјашњавање епизоотиолошке улоге дивљих свиња у одржавању и ширењу бруцелозе на територији Србије, као и на развој ефикаснијих стратегија надзора и контроле ове болести.

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):

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Докторска дисертација под називом „Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији Републике Србије“ докторанткиње Зоране Зуровац Сапунџић је написана у складу са ображложењем наведеним у пријави теме.

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

Докторска дисертација докторанткиње Зоране Зуровац Сапунџић садржи све прописане елементе за завршену докторску дисертацију.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Докторска дисертација Зоране Зуровац Сапунџић под називом „Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији Републике Србије“ представља прво истраживање бруцелозе код дивљих свиња на територији наше земље. Оригинални допринос науци огледа се у свеобухватним серолошким, бактериолошким и молекуларним испитивањима бруцелозе код дивљих свиња. Сprovedена истраживања указала су на епизоотиолошки значај дивљих свиња као резервоара бруцелозе изазване врстом *Brucella suis* биотип 2 у нашој земљи. Уз утврђивање серопреваленције, оригинални допринос се огледа и у изолацији и детаљној генетичкој типизацији изолата бруцела. Бактериолошка изолација, идентификација и детаљна молекуларна типизација која је укључила секвенцирање целог генома изолата ZZS1 добијеног током истраживања, уз SNP анализу и филогенију на нивоу соја, показала је најближу генетичку сродност са изолатима из Немачке, док је MLST-9 типизација показала да он припада секвенционом типу ST16. Анализом MLVA-16 утврђен је и специфичан нумерички профил варијабилних локуса изолата ZSS1 у циљу постизања боље епизоотиолошке резолуције значајне за молекуларну епизоотиологију. Имајући у виду све масовнију примену молекуларних метода у дијагностици различитих патогена, научни допринос се огледа и у процени различитих начина екстракције ДНК из патолошког материјала који представља почетни и најважнији корак у овој врсти дијагностике. Оригинални научни резултати добијени током израде ове дисертације представљају основ за даља истраживања бруцелозе.

4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да или не):

Не

IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања, наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању научноистраживачких резултата истраживача):

Рад у водећем међународном часопису категорија M21:

Zurovac Sapundzic, Zorana, Jadranka Zutic, Natasa Stevic, Vesna Milicevic, Marina Radojicic, Slavoljub Stanojevic, and Sonja Radojicic. 2022. "First Report of *Brucella* Seroprevalence in Wild Boar Population in Serbia" *Veterinary Sciences* 9, no. 10: 575. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100575>
Journal Impact Factor 2021: 2.518

X ОДЛУКЕ ЕТИЧКЕ КОМИСИЈЕ И ОСТАЛЕ НЕОПХОДНЕ ЕТИЧКЕ ОДЛУКЕ (заокружити одлуку која је донета за докторску дисертацију која се оцењује)

1 **А. Поседује Мишљење Етичке комисије ФВМ УБ број 01-901 од 8.11. 2021. године у**
2 **складу са дописом Етичке комисије ФВМ УБ које је достављено Комисији за**
3 **процену подобности кандидата и тема за израду докторских дисертација и**
4 **специјалистичких радова одржаној дана 17. 11. 2021. године.**
5

6 **Б. Поседује Решење Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде РС**
7 **– Управе за ветерину број _____ у складу са дописом Етичке комисије ФВМ УБ**
8 **који је достављен Комисији за процену подобности кандидата и тема за израду**
9 **докторских дисертација и специјалистичких радова одржаној дана**
10 _____

11
12 **Ц. Није потребно издавање Мишљења Етичке комисије ФВМ УБ нити Решења**
13 **Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде РС – Управе за**
14 **ветерину у складу са дописом Етичке комисије ФВМ УБ који је достављен**
15 **Комисији за процену подобности кандидата и тема за израду докторских**
16 **дисертација и специјалистичких радова одржаној дана _____**
17

18 **XI ПРЕДЛОГ:**

19
20 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
21 **три понуђених могућности):**

- 22 **- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана**
- 23 ~~- да се докторска дисертација врати кандидату на дораду~~
- 24 ~~- да се докторска дисертација одбије~~

25
26 **ДАТУМ**

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

27
28 10. 08. 2026. године

29
30
31
32 **Председник комисије**
33 **Др Наташа Стевић, ванредни професор**
34 **Факултет ветеринарске медицине**
35 **Универзитет у Београду**
36
37

38
39
40
41 **Др Дејан Крњаић, редовни професор**
42 **Факултет ветеринарске медицине**
43 **Универзитет у Београду**
44
45

46
47
48
49 **Др Душан Миливојевић, виши научни сарадник**
50 **Институт за молекуларну генетику и генетичко инжињерство**
51 **Универзитет у Београду**
52
53
54
55
56