

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Marija D. Manić

**PRIMENA MOLEKULARNIH METODA U
DIJAGNOSTICI BOLESTI KVRGAVE KOŽE
GOVEDA NA TERITORIJI REPUBLIKE
SRBIJE I NJIHOV ZNAČAJ U PROCENI
EPIZOOTIOLOŠKE SITUACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija D. Manić

**THE APPLICATION OF MOLECULAR
DIAGNOSTIC METHODS IN THE DIAGNOSIS
OF LUMPY SKIN DISEASE IN THE
TERRITORY OF THE REPUBLIC OF SERBIA
AND THEIR SIGNIFICANCE FOR THE
ASSESSMENT OF THE EPIZOOTIOLOGICAL
SITUATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR 1:

Dr Sonja Obrenović, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela

MENTOR 2:

Dr Dejan Vidanović, viši naučni saradnik
Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo"

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dragan Bacić, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela

Dr Jakov Nišavić, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za mikrobiologiju

Dr Tamaš Petrović, naučni savetnik
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Tokom izrade ove disertacije imala sam nesebičnu pomoć i podršku brojnih kolega, profesora, prijatelja i porodice. Ovom prilikom želim da im zahvalim.

.....

Istraživanje tokom izrade ove doktorske disertacije je podržano i delom sprovedeno u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta "Niš". Čast je biti deo takvog kolektiva i raditi u ustanovi koja mladom čoveku daje podršku za profesionalno usavršavanje. Ovom prilikom želela bih da se zahvalim svim kolegama iz Instituta, a posebno direktoru Instituta doc. dr Milošu Petrović za pomoć i podršku tokom izrade doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Sonji Obrenović za požrtvovanost, uloženi trud, nesebičnu stručnu i kolegijalnu pomoć u toku izrade doktorske disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, korisnim savetima, razumevanju i iskrenoj podršci u trenucima kada mi je bila najpotrebnija.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru dr Dejanu Vidanović koji mi je nesebično preneo svoja znanja i iskustvo iz oblasti molekularnih istraživanja.

Zahvaljujem članovima Komisije na pomoći i podršci pri istraživanju i izradi doktorske disertacije.

Iskreno se zahvaljujem kolegi Marku Stojiljković na prelepim trenucima provedenim u zajedničkom radu, izuzetnoj kolegijalnosti, toplim i prijateljskim razgovorima i dobronamernim savetima.

Zahvaljujem se kolegama iz Veterinarskog specijalističkog instituta "Niš" za pomoć pri uzorkovanju materijala i radu u laboratoriji.

Svim ljudima koji su mi na bilo koji način pomogli, zahvaljujem na trudu i dragocenom vremenu koje su mi posvetili.

Zahvalna sam mojim prijateljima na strpljenju, savetima i ljubavi.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na bezgraničnoj ljubavi, podršci, strpljenju i osloncu kojeg sam imala na svakom koraku mog puta.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svom ocu koji nažalost nije doživeo ovaj trenutak, a sigurna sam da bi bio veoma ponosan.

PRIMENA MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI BOLESTI KVRGAVE KOŽE GOVEDA NA TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE I NJIHOV ZNAČAJ U PROCENI EPIZOOTIOLOŠKE SITUACIJE

SAŽETAK

Bolest kvrgave kože (BKK) ili nodularni dermatitis (*engl. Lumpy skin disease - LSD*) je ekonomski važna virusna bolest goveda koja je juna meseca 2016. godine prvi put registrovana na teritoriji R. Srbije. Cilj ove doktorske disertacije bila je izolacija i identifikacija virusa BKK, sekvenciranje dela genoma izolovanog i identifikovanih virusa BKK i molekularno epizootiološka analiza dobijenih podataka, kao i priprema i validacija novih protokola za izvođenje real-time PCR metode za dokazivanje terenskog i vakcinalnog soja virusa i definisanje najspecifičnijeg i najosetljivijeg protokola za dijagnostiku BKK. U okviru doktorske disertacije urađena je epizootiološka analiza epizootije BKK na epizootiološkom području Veterinarskog specijalističkog instituta Niš.

Uzorci za ispitivanje (krv, bioptati kože i nosni brisevi) sakupljeni su od 148 goveda tokom epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš. Ukupno je ispitano je 167 uzoraka od 82 životinje sa kliničkim simptomima i 66 uzoraka krvi od 66 goveda bez kliničkih simptoma koji su uzorkovani pre vakcinacije, kao i 40 uzoraka poreklom od 20 goveda kod kojih su se klinički simptomi pojavili nakon vakcinacije.

Iz uzorka bioptata kože goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima urađena je izolacija virusa bolesti kvrgave kože. Izolovani virus (*Pčinj 1*) je identifikovan primenom klasičnih virusoloških (VNT) i molekularnih metoda (real-time PCR). Sekvenciranje delova genoma virusa BKK i to četiri gena: RPO30, GPCR, EEV i P32 urađeno je iz izolovanog virusa i šest uzoraka bioptata kože (pozitivnih real-time PCR) metodom po Sanger-u. Filogenetska analiza na osnovu dobijenih sekvenci RPO30, GPCR, EEV i P32 gena pokazala je potpunu podudarnost u redosledu nukleotida izolovanog i šest identifikovanih virusa BKK, kao i potpunu podudarnost sa analognim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016*. Utvrđeno je da oba soja virusa izolovana na području R. Srbije (*Serbia/Bujanovac/2016* i *Pčinj 1*), kao i virusi detektovani u bioptatima kože pripadaju podgrupi terenskih sojeva virusa BKK. Analizom filogenetskog stabla formiranog na osnovu poređenja celog genoma soja *Serbia/Bujanovac/2016* sa celim genomima 19 CaPV koji se nalaze u banci gena (*GenBank*) utvrđeno je da se soj *Serbia/Bujanovac/2016* nalazi u podgrupi sa terenskim sojevima virusa BKK, pri čemu je najveća podudarnost u redosledu nukleotida utvrđena sa sojevima izolovanim u Grčkoj, Izraelu, Ruskoj Federaciji i Južnoj Africi.

Dizajniranje sekvenci prajmera i probe za novi real-time PCR protokol za detekciju terenskog soja virusa (Terenski Niš) zasnovano je na razlikama u redosledu nukleotida na LSD008 genu između terenskih i vakcinalnih sojeva, dok je dizajniranje sekvenci prajmera i probe za novi real-time PCR protokol za detekciju vakcinalnog soja virusa (Vakcinalni Niš) zasnovano na razlikama u redosledu nukleotida na genu LSD146 terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK. Ispitivanjem analitičke specifičnosti utvrđeno je da se protokolom Terenski Niš pored virusa BKK detektuju i virusi boginja i ovaca, ali se jasno diferenciraju terenski i vakcinalni soj virusa BKK. Real-time PCR protokol Vakcinalni Niš je specifičan samo za vakcinalne (*Neethling*) sojeve virusa BKK. Ispitivanjem analitičkih i dijagnostičkih performansi potvrđeno je da real-time PCR protokoli Terenski Niš i Vakcinalni Niš poseduju zadovoljavajuće performanse i mogu se koristiti u dijagnostici BKK.

Ispitivanje prisustva genoma virusa BKK iz uzoraka izvršeno je primenom šest protokola za izvođenje real-time PCR metode (Bowden i sar., 2008, KV-2, Terenski Niš, KV-vac, Vakcinalni Niš i komercijalnim real-time PCR) i protokolom za izvođenje nested PCR metode (Menasherow i sar., 2014). Utvrđeno je da je specifičnost protokola Terenski Niš u odnosu na real-time PCR

protokol prema Bowden i sar. (2008) 100%, a osetljivost 99,28%, dok je specifičnost protokola Terenski Niš u odnosu na alternativni real-time PCR protokol KV-2 88,75%, a osetljivost 100%. Utvrđena *Kappa* saglasnost protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2 ($k=0,850$), Bowden i sar. (2008) i Terenski Niš ($k=0,919$) i protokola KV-2 i Terenski Niš ($k=0,930$) pokazala je idealnu usaglašenost ova tri protokola, kao i idealnu usaglašenost navedenih protokola sa komercijalnim real-time PCR testom ($k=1$). Utvrđena *Kappa* saglasnost rezultata dobijenih primenom protokola za izvođenje nested PCR za terenski soj virusa (Menasherow i sar., 2014) sa real-time PCR protokolom Bowden i sar. (2008) ($k=0,467$), kao i protokola KV-2 i Terenski Niš u odnosu na Menasherow i sar. (2014) ($k=0,584$; $k=0,527$) pokazali su da između real-time i nested PCR protokola postoji prilična podudarnost.

Utvrđena je idealna saglasnost ($k=1$) tri real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa (KV-vac, Vakcinalni Niš i komercijalnog real-time PCR testa). Idealna usaglašenost sva tri protokola za izvođenje real-time PCR metode utvrđena je i u odnosu na protokol za nested PCR (Menasherow i sar., 2014) ($k=1$).

Tokom epizootije BKK u R. Srbiji je registrovano 225 žarišta, od toga na ispitivanom području 189, odnosno 84% od ukupnog broja žarišta. Najveći broj žarišta bio je registrovan u Pčinjskom okrugu (169; 75,1% svih žarišta u Srbiji), a zatim u Pirotskom (11; 4,9%), Jablaničkom (7; 3,1%) i u Topličkom okrugu (2; 0,9%). Žarišta su registrovana na područjima sa nadmorskom visinom od 260 do 1495 m, pri čemu je prosečna nadmorska visina iznosila 992 m. Mapiranjem žarišta i analizom prostorne i vremenske distribucije utvrđena je prosečna udaljenost najbližih žarišta od 4,32 km, a prosečno vreme pojave novih žarišta bilo je 9 dana. Prosečna stopa morbiditeta na nivou stada iznosila je 13,6%, mortaliteta 0,4% i letaliteta 3,25%. Najveći morbiditet utvrđen je u kategoriji mlečnih krava (94,55%), a najveći broj obolelih životinja bio je stariji od 5 godina (57,3%).

Kod 20 goveda kod kojih su se klinički simptomi ispoljili posle vakcinacije utvrđeno je prisustvo terenskog ili istovremeno prisustvo terenskog i vakcinalnog soja virusa što ukazuje da su životinje vakcinisane u inkubaciji i da su klinički simptomi kod vakcinisanih goveda posledica infekcije i ne predstavljaju postvakcinalne komplikacije.

Ključne reči: bolest kvrgave kože, goveda, real-time PCR, nested PCR, izolacija virusa, sekvenciranje, epizootiologija, postvakcinalne komplikacije

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

UDK broj: 616.9 : 577.2 : 636.2

THE APPLICATION OF MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LUMPY SKIN DISEASE IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF SERBIA AND THEIR SIGNIFICANCE FOR THE ASSESSMENT OF EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION

SUMMARY

Lumpy skin disease (LSD) is an economically important bovine viral disease that was first registered in the territory of the Republic of Serbia in June 2016. The aim of this doctoral dissertation was the isolation and identification of LSD virus, sequencing part of the genome of the isolated and identified LSD virus and molecular epizootiological analysis of the obtained data, as well as preparation and validation of new protocols for real-time PCR method to detect field and vaccine strain and define the most specific and sensitive protocol. An epizootiological analysis of the LSD epizootic that occurred in the epizootiological area controlled by the Veterinary Specialized Institute Nis in 2016, was also conducted within this doctoral dissertation.

Samples for testing (blood, skin biopsies and nasal swabs from LSD suspected or susceptible cattle) were collected from 148 animals during the LSD epizootic in the epizootiological area of VSI Nis. A total of 167 samples from 82 animals with clinical symptoms and 66 blood samples from 66 animals without clinical symptoms that were sampled before vaccination, as well as 40 samples from 20 animals in which clinical symptoms appeared after vaccination, were examined.

Isolation of the Lumpy Skin Disease Virus was performed from a bovine skin biopsies that originated from animals with clinical symptoms. The isolated virus (*Pčinj 1*) was identified using classical virological (VNT) and molecular diagnostic methods (real-time PCR). Sequencing of parts of the LSDV genome, namely four genes: RPO30, GPCR, EEV and P32, was performed from the isolated virus and six skin biopsy samples (positive real-time PCR) by the Sanger method. Phylogenetic analysis based on the obtained sequences of RPO30, GPCR, EEV and P32 genes showed complete match in the sequence of nucleotides from isolated and six identified LSD viruses, as well as with analogous sequences of the *Serbia/Bujanovac/2016* LSDV strain. It was determined that both strains of viruses isolated in the Republic of Serbia (*Serbia/Bujanovac/2016* and *Pčinj 1*), as well as viruses detected in skin biopsies belong to the subgroup of field strains of LSDV. Analysis of the phylogenetic tree formed on the basis of comparison of the whole genome of the strain *Serbia/Bujanovac/2016* with the whole genomes of 19 CaPV located in the gene bank (*GenBank*) showed that the *Serbia/Bujanovac/2016* strain is in a subgroup along with field strains of LSDV and has the highest nucleotide sequence match with LSDV strains isolated in Greece, Israel, the Russian Federation and South Africa.

The design of primer and probe sequences for the new real-time PCR protocol for field virus strain detection (Terenski Niš) was based on differences in the nucleotide sequence of the LSD008 gene between field and vaccine strains, while the design of primer and probe sequences for the new vaccine strain detection protocol (Vakcinalni Nis) was based on differences in the sequence of nucleotides on the LSD146 gene from both field and vaccine LSDV strains. By examining the analytical specificity, it was determined that the Terenski Niš protocol detects Goatpox and Sheeppox viruses in addition to the LSDV, but clearly differentiates the field and vaccine strain of the LSDV. Real-time PCR protocol Vakcinalni Nis is specific only for vaccine (*Neethling*) strains of LSDV. Analytical and diagnostic performance testing confirmed that the real-time PCR protocols Terenski Niš and Vakcinalni Nis have satisfactory performance and can be used in the diagnosis of LSD.

Examination for the presence of LSDV genomes from the samples was performed using six different real-time PCR protocols (Bowden et al., 2008, KV-2, Terenski Niš, KV-vac, Vakcinalni Niš and commercial real-time PCR) as well as one nested PCR protocol

(Menasherow et al., 2014). It was found that the specificity of the Terenski Niš protocol in relation to the real-time PCR protocol according to Bowden et al. (2008) is 100%, and sensitivity 99.28%, while the specificity of the Terenski Niš protocol in relation to the alternative real-time PCR protocol KV-2 is 88.75%, and the sensitivity is 100%. Established *Kappa* agreement protocol Bowden et al. (2008) and KV-2 ($k = 0.850$), Bowden et al. (2008) and Terenski Niš ($k = 0.919$) and protocols KV-2 and Terenski Niš ($k = 0.930$) showed ideal agreement of these three protocols, as well as ideal agreement of these protocols with commercial real-time PCR test ($k = 1$). *Kappa* found the agreement of the results obtained using the protocol for performing nested PCR for field virus strain (Menasherow et al., 2014) with the real-time protocol of Bowden et al. (2008) ($k = 0.467$), as well as the KV-2 protocol and Terenski Niš in relation to Menasherow et al. (2014) ($k = 0.584$; $k = 0.527$), showing that there is considerable agreement between real-time and nested PCR.

The ideal agreement ($k = 1$) of the three real-time PCR protocols for the detection of the vaccine strain of the virus (KV-vac, Vakcinalni Nis and the commercial real-time PCR test) was determined. The ideal compliance of all three protocols for performing the real-time PCR method was also determined in relation to the nested PCR protocol (Menasherow et al., 2014) ($k = 1$). During the epizootic of LSD in the Republic of Serbia in 2016, 225 outbreaks were registered in total, out of which 189 (84%) were located in the studied area. The largest number of outbreaks was registered in Pčinja District (75.1% of all outbreaks in Serbia), followed by Pirot (4.9%), Jablanica (3.1%) and Toplica District (0.9%). Outbreaks were registered in different altitudes, ranging from 260 to 1495 meters above the sea level. The analysis of spatial and temporal distribution determined the average distance of the nearest outbreak locations of 4.32 km, and the average time of appearance of new outbreaks was 9 days. The average morbidity rate at the herd level was 13.6%, mortality 0.4% and lethality 3.25%. The highest morbidity was found in the category of dairy cows (94.55%), and the largest number of infected animals was older than 5 years (57.3%).

In 20 cattle in which LSD clinical symptoms manifested after vaccination, the presence of field or simultaneous presence of field and vaccine LSDV strains were determined, which indicates that the animals probably had been vaccinated during incubation period and that clinical symptoms are due to infection and do not represent post-vaccination complications.

Key words: lumpy skin disease, cattle, real-time PCR, nested PCR, virus isolation, sequencing, epizootiology, post-vaccination complications

Science area: Veterinary Medicine

Field area: Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDK: 616.9 : 577.2 : 636.2

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 ISTORIJAT IZUČAVANJA BOLESTI KVRGAVE KOŽE GOVEDA	3
2.2 ETIOLOGIJA	3
2.2.1 Morfološke karakteristike virusa.....	3
2.2.2 Genom virusa BKK.....	4
2.2.3 Replikacija virusa BKK	4
2.3 GEOGRAFSKA RAŠIRENOST BOLESTI KVRGAVE KOŽE.....	5
2.3.1 Geografska raširenost bolesti kvrgave kože u svetu.....	5
2.3.2 Bolest kvrgave kože u Evropi i zemljama u okruženju	5
2.3.3 Pojava BKK u Republici Srbiji	6
2.4 EPIZOOTIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESTI KVRGAVE KOŽE	6
2.5 PRENOŠENJE VIRUSA	7
2.6 KLINIČKA SLIKA BKK	9
2.7 IMUNSKI ODGOVOR	10
2.8 PATOMORFOLOŠKI NALAZ	10
2.9 DIJAGNOSTIKA BKK.....	11
2.9.1 Laboratorijska dijagnostika BKK.....	11
2.9.1.1 Izolacija virusa na kulturi ćelija.....	11
2.9.1.2 Molekularne metode za dokazivanje genoma virusa BKK.....	12
2.9.1.3 Sekvenciranje genoma virusa BKK.....	14
2.9.1.4 Serološka dijagnostika BKK.....	15
2.10 MERE KONTROLE I ERADIKACIJE BOLESTI	15
2.10.1 Vakcinacija.....	16
2.10.2 Postvakinalne komplikacije.....	16
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	18
4. MATERIJAL I METODE.....	19
4.1 IZOLACIJA VIRUSA BOLESTI KVRGAVE KOŽE.....	19
4.1.1 Uzorci za izolaciju.....	19
4.1.2 Materijal za izolaciju virusa i izvođenje testa virus neutralizacije	19
4.1.3 Priprema uzoraka za izolaciju virusa.....	19
4.1.4 Izolacija i identifikacija virusa	19
4.1.4.1 Titracija virusa	20
4.1.4.2 Virus neutralizacioni test (VNT)	20
4.2 SEKVENCIRANJE DELOVA GENOMA VIRUSA BKK I IZRADA FILOGENETSKOG STABLA	21
4.2.1 Sekvenciranje delova genoma virusa BKK.....	21
4.2.2 Izrada filogenetskog stabla.....	22
4.3 ISPITIVANJE PRISUSTVA GENOMA VIRUSA BKK MOLEKULARNIM METODAMA	23
4.3.1 Uzorci za ispitivanje.....	23
4.3.2 Materijal za dokazivanje genoma virusa BKK.....	23
4.3.3 Priprema uzoraka za ekstrakciju DNK.....	24
4.3.3.1 Ekstrakcija DNK.....	24
4.3.4 Molekularne metode u detekciji virusa BKK.....	25
4.3.4.1 Protokol Bowden i sar. (2008) i KV-2.....	25
4.3.4.2 Nested PCR (RFLP PCR) - Menasherow i sar. (2014).....	27
4.3.4.3 Komercijalni real-time PCR test.....	29

4.3.4.4	Protokol - KV-vac.....	29
4.4	PRIPREMA I VALIDACIJA PROTOKOLA ZA IZVOĐENJE METODE REAL-TIME PCR ZA DETEKCIJU TERENSKOG I VAKCINALNOG SOJA VIRUSA BKK	30
4.4.1	Protokol za detekciju terenskih sojeva virusa BKK	30
4.4.2	Protokol za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK	31
4.4.3	Ispitivanje analitičkih i dijagnostičkih karakteristika real-time PCR protokola Terenski Niš i Vakcinalni Niš	32
4.4.3.1	Ispitivanje efikasnosti	32
4.4.3.2	Ispitivanje analitičke osetljivosti	32
4.4.3.3	Ispitivanje analitičke specifičnosti	33
4.4.3.4	Određivanje granične vrednosti (Cut-off).....	33
4.4.3.5	Ispitivanje unakrsne reaktivnosti	33
4.4.3.6	Ispitivanje ponovljivosti	34
4.4.3.7	Ispitivanje reproduktivnosti	34
4.4.3.8	Ispitivanje robustnosti.....	34
4.4.3.9	Ispitivanje uzoraka novim protokolima za izvođenje real-time PCR metode Terenski Niš i Vakcinalni Niš	35
4.5	EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA EPIZOOTIJE BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ 35	35
4.5.1	Područje ispitivanja.....	35
4.5.2	Prikupljanje epizootioloških podataka	36
4.6	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	36
5.	REZULTATI.....	37
5.1	REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA BKK, SEKVENCIRANJA GENOMA I MOLEKULARNIH ISPITIVANJA.....	37
5.1.1	Rezultati izolacije virusa BKK.....	37
5.1.2	Rezultati titracije izolovanog virusa (Pčinj 1) i VNT.....	37
5.2	REZULTATI SEKVENCIRANJA DELA GENOMA VIRUSA BKK I FILOGENETSKA ANALIZA	37
5.2.1	Filogenetska analiza na osnovu RPO30, GPCR, EEV i P32 gena	37
5.2.2	Filogenetska analiza celog genoma virusa BKK soj Serbia/Bujanovac/2016.....	40
5.3	REZULTATI ISPITIVANJA KLINIČKIH UZORAKA MOLEKULARNIM METODAMA.....	41
5.3.1	Rezultati dobijeni primenom protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2	41
5.3.2	Rezultati dobijeni protokolom - Menasherow i sar. (2014).....	42
5.3.3	Rezultati dobijeni komercijalnim real-time PCR testom.....	44
5.3.4	Rezultati dobijeni protokolom KV-vac	44
5.4	REZULTATI VALIDACIJE NOVIH REAL-TIME PCR PROTOKOLA ZA DETEKCIJU TERENSKOG I VAKCINALNOG SOJA VIRUSA BKK.....	45
5.4.1	Rezultati validacije real-time PCR protokola za detekciju terenskog soja virusa BKK (Terenski Niš).....	45
5.4.1.1	Efikasnost protokola Terenski Niš.....	45
5.4.1.2	Analitička osetljivost protokola Terenski Niš.....	46
5.4.1.3	Analitička specifičnost protokola Terenski Niš	46
5.4.1.4	Granična vrednost (Cut-off) protokola Terenski Niš	46
5.4.1.5	Unakrsna reaktivnost protokola Terenski Niš.....	46
5.4.1.6	Ponovljivost protokola Terenski Niš	46
5.4.1.7	Reproduktivnost protokola Terenski Niš	47
5.4.1.8	Robustnost protokola Terenski Niš.....	48
5.4.2	Rezultati ispitivanja dobijeni primenom protokola Terenski Niš.....	48
5.4.3	Rezultati validacije real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK (Vakcinalni Niš)	49
5.4.3.1	Efikasnost protokola Vakcinalni Niš	49
5.4.3.2	Analitička osetljivost protokola Vakcinalni Niš	50

5.4.3.3	Analitička specifičnost protokola Vakcinalni Niš	50
5.4.3.4	Granična vrednost (Cut-off) protokola Vakcinalni Niš	50
5.4.3.5	Unakrsna reaktivnost protokola Vakcinalni Niš	50
5.4.3.6	Ponovljivost protokola Vakcinalni Niš	50
5.4.3.7	Reproduktivnosti protokola Vakcinalni Niš	51
5.4.3.8	Robustnost protokola Vakcinalni Niš	52
5.4.4	Rezultati ispitivanja dobijeni protokolom Vakcinalni Niš	52
5.4.5	Određivanje specifičnosti i osetljivosti novih real-time PCR protokola	53
5.4.5.1	Određivanje specifičnosti i osetljivosti protokola Terenski Niš	53
5.4.6	Određivanje specifičnosti i osetljivosti protokola za nested PCR (Menasherow i sar., 2014) u odnosu na protokole za izvođenje real-time PCR metode (Bowden i sar., 2008) i KV-2	54
5.4.7	Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR i nested PCR metode za detekciju terenskog soja virusa	56
5.4.8	Kappa (κ) statistička analiza rezultata dobijenih primenom različitih protokola za detekciju terenskog soja virusa BKK	57
5.4.9	Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR i nested PCR metode za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK	60
5.4.10	Kappa (κ) statistička analiza rezultata dobijenih primenom različitih protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK	60
5.5	EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA EPIZOOTIJE BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ	62
5.5.1	Prvi slučaj BKK na području R. Srbije	62
5.5.2	Analiza pojave žarišta BKK i izrada epizootiološke karte (mapirane žarišta)	62
5.5.3	Analiza prostorne i vremenske distribucije epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš ..	66
5.5.4	Stope morbiditeta, mortaliteta i letaliteta na epizootiološkom području VSI Niš	67
5.6	ANALIZA MERA KONTROLE I SUZBIJANJA BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ	69
5.6.1	Mere suzbijanja BKK pre sprovođenja vakcinacije	69
5.6.2	Mere kontrole i suzbijanja nakon vakcinacije	69
5.6.3	Pojava kliničkih simptoma kod goveda nakon vakcinacije protiv BKK	70
6.	DISKUSIJA	72
7.	ZAKLJUČCI	82
8.	LITERATURA	84

1. UVOD

Bolest kvrgave kože (BKK) ili nodularni dermatitis (lat. *Exanthema nodularis bovis*, engl. *Lumpy skin disease - LSD*) je zarazno oboljenje goveda i bivola izazvano virusom koji pripada familiji *Poxviridae*, podfamiliji *Chordopoxvirinae* i rodu *Capripoxvirus*. Po svojim osnovnim biološkim osobinama virus bolesti kvrgave kože se ne razlikuje od drugih virusa koji pripadaju familiji *Poxviridae*.

U većini afričkih zemalja BKK je enzootska bolest, ali se od 2012. godine progresivno širila prema Bliskom Istoku, južnoj Evropi, Ruskoj Federaciji i oblasti Kavkaza.

Prirodni domaćini virusa bolesti kvrgave kože (virus BKK) su goveda (*Bos taurus* i *Bos indicus*) i azijski bivo (*Bubalus bubalis*), a virus je izolovan i iz pojedinih vrsta obolelih antilopa, što ukazuje na mogućnost infekcije i drugih preživara.

Izvor infekcije u prirodi su obolele životinje. Iz inficiranog organizma virus se izlučuje pljuvačkom, iscetkom iz nosa i oka, spermom, a najveća koncentracija virusa se nalazi u kožnim čvorovima i krastama inficiranih životinja. Virus BKK je veoma otporan u spoljašnjoj sredini. Iako nepotpuni, podaci o osnovnim epizootiološkim karakteristikama BKK ukazuju na visok potencijal stacioniranja i dugotrajnog održavanja uzročnika na određenom području nakon prve pojave bolesti, što za posledicu ima izrazite teškoće u kontroli širenja i suzbijanju bolesti. U populaciji prijemljivih životinja, najznačajniju ulogu u prenosu infekcije imaju hematofagni insekti. Prenos virusa BKK se odvija tokom ishrane insekata krvlju inficiranih ili obolelih životinja, mehaničkim putem, ali se ne može potpuno isključiti uloga pojedinih vrsta hematofagnih insekata kao bioloških vektora. U zavisnosti od geografskih, klimatskih i ekoloških karakteristika područja u kojima se BKK javlja, različite vrste hematofagnih insekata mogu imati ulogu u prenosu virusa. Sezonska aktivnost hematofagnih insekata takođe uslovljava i sezonsku pojavu bolesti u mesecima kada su oni najaktivniji. Smatra se da prenos virusa direktnim kontaktom između životinja nema značajnu ulogu u epizootiologiji BKK, ali su utvrđeni slučajevi infekcije goveda nastali ingestijom kontaminirane hrane i vode, kao i polnim putem (prirodni pripust i veštačko osemenjavanje).

Klinička slika BKK kod inficiranih goveda može se ispoljiti od blage do veoma teške forme sa smrtnim ishodom. Bolest kvrgave kože se klinički manifestuje porastom telesne temperature, naglim padom mlečnosti, pojačanom salivacijom, pojavom iscetka iz nosa i očiju, otokom limfnih čvorova i pojavom čvorova po koži i sluzokožama koji predstavljaju karakterističan simptom bolesti.

Dijagnostika BKK se zasniva na prepoznavanju karakterističnih kliničkih znakova, a potvrđuje se primenom virusoloških, molekularnih i seroloških metoda, odnosno izolacijom virusa na kulturi tkiva i identifikacijom, primenom različitih molekularnih metoda i detekcijom specifičnih antitela.

Izolaciju virusa BKK je najbolje raditi iz uzoraka kožnih čvorova, a pored toga moguće je koristiti i uzorke briseva sa sluzokože nosa i usta.

Prema Svetskoj organizaciji za zdravlje životinja (*The World Organization for Animal Health, Office International des Epizooties - OIE*), virus neutralizacioni test (VNV) se smatra jedinim validovanim testom za serološku dijagnostiku BKK. Iako je VNT visoko specifičan (100%), nedostaci ovog testa su rad sa živim virusom što zahteva dobro opremljene laboratorije visokog nivoa biosigurnosti, kao i mali broj uzoraka koji se mogu pregledati. U cilju utvrđivanja prisustva antitela na virus BKK mogu se koristiti i test indirektno imunofluorescencije, test imunodifuzije u gelu i imunoenzimski test, a osetljivost i specifičnost navedenih testova je manja u odnosu na VNT.

Danas se u cilju dokazivanja prisustva virusa BKK u prijemljivoj populaciji životinja, kao i rane dijagnostike kliničkih slučajeva primenjuju metode molekularne dijagnostike: lančana reakcija polimeraze (*polymerase chain reaction* - PCR), lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (*real-time polymerase chain reaction* - *real-time PCR*) i sekvenciranje delova genoma ili celog genoma virusa. Zahvaljujući visokoj specifičnosti i osetljivosti ove metode su uvedene kao opšte prihvaćene za dokazivanje virusa u ispitujućem materijalu. Prednost molekularnih metoda je u njihovoj visokoj osetljivosti, relativno brzom izvođenju, mogućnosti analize velikog broja uzoraka, upotrebi dobijenih rezultata u molekularnoj epizootologiji, kao i ispitivanju uzoraka koji nisu podesni za izolaciju virusa. Dostupni su protokoli za izvođenje PCR i real-time PCR metoda kojima se otkrivaju svi virusi roda *Capripoxvirus*, zatim protokoli za izvođenje PCR metoda kojima je moguće razlikovati viruse unutar roda, a poslednjih godina istraživanja su usmerena na razvijanje protokola za izvođenje PCR metoda kojima se može razlikovati terenski od vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa BKK.

Pojavom epizootije BKK izvan afričkog kontinenta, na području Bliskog Istoka i Balkanskog poluostrva, primena trenutno dostupnih vakcina je, pored njihove visoke efikasnosti u kontroli bolesti, imala za posledicu i pojavu postvakcinalnih komplikacija. S obzirom da klinički simptomi koji su opisani kod životinja nakon vakcinacije mogu da podsećaju na simptome bolesti, od izuzetne je važnosti postojanje standardizovanih dijagnostičkih metoda koje omogućavaju razlikovanje postvakcinalnih komplikacija od kliničkih simptoma bolesti. Imajući u vidu da je BKK egzotična bolest za područje Evrope, tj. da se do 2015. godine nije javljala u Evropi, i pored činjenice da je bila prisutna u zemljama u kojima je stočarstvo osnovna grana privrede, mali resursi koji su izdvajani za detaljna ispitivanja u tim zemljama uticali su da se Evropa susretne sa određenim problemima u dijagnostici. Osnovni problem je upravo nedostatak dijagnostičkih testova kojima bi u zemljama u kojima se bolest pojavila i u kojima se sprovodi vakcinacija, a imajući u vidu postvakcinalne komplikacije, razlikovali terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK.

Rezultati određenih studija pokazuju da postoji mogućnost rekombinacije gena između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa BKK. Ovi preliminarni rezultati su od neprocenljivog značaja za sadašnju i buduću kontrolu BKK i upotrebu atenuiranih vakcina tokom aktivnih epizootija. Izveštaji o „neuspešnoj vakcinaciji“ i postvakcinalnim komplikacijama tj. „bolesti vakcine“ moraju se dodatno ispitati u kontekstu trenutno dostupnih genetskih dokaza da bi se utvrdilo da li su takve situacije češće nego što se ranije smatralo, i da li je stvaranje novih sojeva virusa sa izmenjenom virulencijom realnost. Gotovo je sigurno da će se BKK i dalje širiti, a vakcinacija se pokazala jedinom efikasnom metodom prevencije i kontrole epizootije velikih razmera. Imajući u vidu dosadašnja iskustva sa BKK, najefikasniji način u kontroli i suzbijanju bolesti je pored primene imunoprofilakse i stamping out metoda.

Treba napomenuti i da se pojava epizootije egzotičnih bolesti kao što je BKK na novoj teritoriji karakteriše određenim epizootskim procesom, i da epizootiološka analiza pruža važna saznanja koja će dati doprinos efikasnijoj kontroli BKK, ali da je neophodna primena specifičnih metoda dijagnostike, kao i brzo sprovođenje mera kontrole i suzbijanja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 ISTORIJAT IZUČAVANJA BOLESTI KVRGAVE KOŽE GOVEDA

Klinički sindrom bolesti kvrgave kože je prvi put opisan u Zambiji (ranije Severnoj Rodeziji) 1929. godine od strane MacDonalda. Prvi slučaj BKK je tada opisan kao “kožna bolest sa nejasnim propratnim kliničkim simptomima“, a bolest je nazvana „pseudo-urtikarija“ (Morris, 1931). U početku, simptomi bolesti su pripisivani hipersenzitivnim reakcijama na ubode insekata ili posledicama trovanja biljkama (Weiss, 1968). Von Backstrom je istu bolest nazvao “Ngamiland bolest goveda” kada se je oktobra 1943. godine pojavila u Ngamilandu, severno-zapadnom okrugu Bocvane, i prvi je opisao kliničke simptome i infektivan karakter bolesti (Von Backstrom, 1945). U periodu između 1943. i 1945. godine, slučajevi bolesti su se javljali u Zimbabveu (Južna Rodezija), Bocvani i Južnoafričkoj Republici. Epizootija BKK u Južnoafričkoj Republici, koja je trajala sve do 1949. godine, dovela je do velikih ekonomskih gubitaka (Diesel, 1949; Davies, 1991a). Nakon pojave bolesti u provinciji Marico u Južnoafričkoj Republici Thomas, Robinson i Alexander su prvi demonstrirali prenos infektivnog agensa tako što su govedima inokulisali suspenziju kožnih čvorova (Thomas i Mare, 1945). Prve epizootije BKK u Južnoj Africi javljale su se u stadima goveda koja su boravila u vlažnim i toplim predelima gde je velika populacija hematofagnih insekata (Thomas i Mare, 1945; Weiss, 1968). Istorijski podaci u periodu od 1945. do 1998. godine ukazuju da se laboratorijska dijagnostika BKK bazirala na izolaciji virusa i identifikaciji primenom VNT sve do 1998. godine kada je razvijen prvi protokol za izvođenje PCR metode za detekciju virusa iz roda *Capripoxvirus* (Ireland and Binopal, 1998).

2.2 ETIOLOGIJA

Virus bolesti kvrgave kože (virus BKK) pripada rodu *Capripoxvirus*, podfamiliji *Chordopoxvirinae* i familiji *Poxviridae* i vrlo je sličan ostalim virusima iz roda *Capripoxvirus*, odnosno virusu boginja ovaca (*Sheeppox virus - SPPV*) i virusu boginja koza (*Goatpox virus - GTPV*) (International Committee on Taxonomy of Viruses and Virus Taxonomy, Release). Iako genom virusa BKK ima 96% podudarnosti u redosledu nukleotida sa SPPV i GTPV, u filogenetskim studijama zasnovanim na parcijalnom i kompletnom sekvenciranju genoma utvrđeno je da se ova tri virusa genetski međusobno razlikuju (Tulman i sar., 2001, Tulman i sar., 2002).

2.2.1 Morfološke karakteristike virusa

Virus BKK spada među najveće viruse, a virusna čestica je oblika cigle (četvrtast oblik) veličine 290 x 270 nm (Kitching i Smale, 1986). Virus BKK sadrži dvolančanu dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i spoljašnju dvostruku proteinsku membranu, odnosno kapsid koji se sastoji od tubularnih kapsomera, raspoređenih nepravilno, koje virionu daju karakterističan izgled. Virioni poseduju i spoljašnji omotač od lipoproteina koji obavija centralno jezgro (DNK i kapsid) i dva lateralna telašca čija uloga nije poznata. Virion koji se oslobađa iz ćelija pupljenjem sadrži dodatni omotač od ćelijskih lipida i nekoliko virus - specifičnih proteina, za razliku od viriona koji se oslobađa destrukcijom ćelija. Iako su i virioni sa omotačem i virioni bez omotača infektivni, virioni sa omotačem lakše ulaze u nove ćelije i smatraju se važnijim prilikom diseminacije virusa kroz organizam inficirane životinje (Murphy i sar., 1999; Maclachlan i Dubovi, 2010).

2.2.2 Genom virusa BKK

Unutar kapsida virusa BKK nalazi se genom u vidu linearnog, dvostrukog DNK lanca dužine 150773 bp. Centralni kodirajući region genoma virusa je ograničen sa dva identična invertovana terminalna ponavljanja od 2418 bp. Genom virusa BKK kodira 156 gena tj. ima 156 otvorenih okvira čitanja (*engl. open reading frame*; ORF). Poređenjem genoma virusa BKK sa drugim virusima podfamilije *Chordopoxvirinae* otkriveno je da postoji 146 konzerviranih gena, a poznato je da je njihova funkcija ključna za sintezu strukturnih proteina virusa, proteina koji su uključeni u transkripciju i biogenezu informacione ribonukleinske kiseline (iRNK), metabolizam nukleotida i replikaciju DNK. Centralni region genoma virusa BKK ima visok stepen sličnosti (prosečno 65%) sa genomima drugih poksvirusa sisara, posebno poksvirusa svinja i kunića. Jedan od najvažnijih gena svih kapripoksvirusa (*Capripoxvirus* - CaPV) je gen P32 (ORF074) koji kodira glavne antigene determinante važne za patogenezu bolesti (Chand i sar., 1994) i često se koristi za razvoj protokola za izvođenje PCR i real-time PCR metoda za detekciju CaPV (Ireland i Binopal, 1998; Heine i sar., 1999; Bowden i sar., 2008). Većina razlika u redosledu nukleotidnih sekvenci genoma virusa BKK u odnosu na ostale CaPV vezana je za gene koji su smešteni na terminalnom regionu genoma i koji su važni za virulenciju virusa i vrstu domaćina, odnosno prijemčivu životinjsku vrstu (Tulman i sar., 2001). Značajne razlike u nukleotidnim sekvencama genoma CaPV zabeležene su u delu nekoliko gena. U delu RPO30 gena (*RNA polymerase subunit*) koji kodira subjedinicu RNK polimeraze od 30 kDa važnu za proces umnožavanja virusa, otkriveno je da postoji delecija od 21 bp kod SPPV, dok ova delecija nije prisutna kod virusa BKK i GTPV (Lamien i sar., 2011a). U delu GPCR gena (*host-specific G-protein coupled chemokine receptor*), koji kodira transmembranske proteine uključene u imunomodulaciju domaćina, pronađena je delecija od 12 bp kod terenskih sojeva virusa BKK. Ova delecija se smatra važnom razlikom između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa BKK (Le Goff i sar., 2009). Analiza sekvenci delova genoma virusa BKK pokazala je da se razlika od 12 bp u GPCR genu može koristiti za razvoj DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals* - razlikovanje zaraženih od vakcinisanih životinja) testova kojima se može pratiti infekcija terenskim sojem virusa BKK u stadima koja su vakcinisana protiv BKK (Agianniotaki i sar., 2017b). Kod vakcinalnih sojeva virusa BKK dokazana je delecija od 27 bp u delu EEV gena (*extracellular enveloped virions gene*) koji kodira glikoprotein prisutan na površinama čestica virusa i zaraženih ćelija domaćina. Ova delecija nije prisutna kod terenskih sojeva virusa BKK, SPPV i GTPV (Menasherow i sar., 2014). Osim navedenih delecija postoji i veliki broj razlika u redosledu nukleotida (*mismatches*) između genoma virusa BKK, SPPV i GTPV koje takođe mogu biti osnova za razvoj novih molekularnih protokola za razlikovanje virusa iz roda *Capripoxvirus*.

2.2.3 Replikacija virusa BKK

U ćelije domaćina virus BKK ulazi mikropinocitozom koja podseća na proces apsorpcije ostataka apoptotske ćelije od strane fagocita. Sam proces se odvija preko receptora površinskog proteina fosfatidilserina za koji se virus vezuje, čime se aktivira ćelijska p21 kinaza-1 (Mercer i Helenius, 2008). Virusna čestica sa omotačem ulazi u ćeliju domaćina putem endocitoze. Unutar endocitne vezikule omotač virusa se gubi, zatim dolazi do fuzije spoljašnje membrane virusa sa membranom vezikule pri čemu se virus oslobađa u citoplazmu ćelije domaćina gde se i odvija replikacija virusa BKK unutar intracitoplazmatskih inkluzionih tela (Prozesky i Barnard, 1982). Virusne čestice se nakon replikacije oslobađaju iz ćelija na dva načina: pupljenjem, što je ređi način, kada nastaju virusne čestice sa omotačem ili lizom ćelije kada nastaju virusne čestice bez omotača (Murphy i sar., 1999).

2.3 GEOGRAFSKA RAŠIRENOST BOLESTI KVRGAVE KOŽE

2.3.1 Geografska raširenost bolesti kvrgave kože u svetu

Bolest kvrgave kože goveda je prvi put opisana na teritoriji Zambije (bivša Severna Rodezija) 1929. godine i dugo je bila ograničena na južni deo Afrike. Tokom 40-ih godina 20-og veka BKK se proširila u centralne i severne delove i trenutno je prisutna svuda u Africi, uključujući i Madagaskar (Tuppurainen, 2018a). U istočnoj Africi BKK se javila prvi put u Keniji 1957. godine (Weiss, 1968), zatim u Sudanu 1970. godine, a na teritoriji zapadne Afrike bolest se proširila 1974. godine kada je dijagnostikovana na području Nigerije. Tokom 1977. godine BKK je registrovana i u Mauritaniji, Maliju, Gani i Liberiji. Osamdesetih godina prošlog veka prvi slučajevi bolesti su se javili u Tanzaniji, Somaliji i Kamerunu (OIE¹, 2018). Bolest kvrgave kože je dugo bila ograničena na područje Afrike južno od Sahare, dok je danas prisutna na području cele Afrike, izuzev Libije, Alžira, Maroka i Tunisa koje se još uvek smatraju državama slobodnim od BKK (Tuppurainen, 2018a). Uprkos merama kontrole i eradikacije bolesti, 1988. godine došlo je do epizootije većih razmera u Egiptu (Ali i sar., 1990), odakle se bolest, samo godinu dana kasnije, proširila po prvi put van granica afričkog kontinenta kada se pojavila na teritoriji Izraela (Yeruham i sar., 1995). U Saudijskoj Arabiji BKK je potvrđena 1992. godine (Greth i sar., 1992), na područje Kuvajta 1991. godine, Libana 1993. godine, Jemena 1995. godine, Ujedinjenih Arapskih Emirata 2000. godine, Bahreina 2003. godine, Izraela 2006-2007. godine i Omana 2010. godine (Tuppurainen i Oura, 2012).

2.3.2 Bolest kvrgave kože u Evropi i zemljama u okruženju

Posebna pažnja praćenju epizootiološke situacije BKK u svetu posvećena je u periodu od 2015. do 2016. godine, kada je bolest pokazala značajni potencijal širenja na područje Balkanskog poluostrva i bila pretnja za dalje širenje na područje Evrope (Tasioudi i sar., 2016; Sevik i Dogan, 2017; Agianniotaki i sar., 2017b; Zeynalova i sar., 2016).

Tokom 2013. godine BKK je registrovana u južnom delu Turske (Wainwright i sar., 2013), da bi u naredne dve godine epizootija zahvatila celu teritoriju Turske (Timurkan i sar., 2016). Pojavom BKK u Turskoj povećala se mogućnost prenosa bolesti u države članice Evropske unije (EU) (Tuppurainen i Oura, 2014; Tuppurainen i Oura, 2012; Beard, 2016). U novembru 2014. godine bolest je potvrđena na ostrvu Kipar, a u junu 2015. godine u turskom distriktu Edirne udaljenom 8 km od granice sa Grčkom. U avgustu 2015. godine bolest je prvi put registrovana na teritoriji Grčke, u oblasti Evros na udaljenosti 15 km od granice sa Turskom. To je bila prva pojava BKK na teritoriji EU. U Grčkoj bolest je u početku bila ograničena na teritoriju oblasti Evros, a zatim je uprkos sprovedenim merama kontrole nastavila da se širi na zapad zemlje (Ksanti, Kavala, Limnos, Rodopi, Halkidiki i Solun) (Tasioudi i sar., 2016). U julu 2015. godine BKK je prvi put registrovana na teritoriji Ruske Federacije, u pograničnim područjima sa Gruzijom i Azerbejdžanom, da bi se zatim proširila na područje Kavkaza (Dagestan, Čečenija i Severna Osetija) (Sprygin i sar., 2018a). U aprilu 2016. godine, epizootija BKK se pojavila u severnim regionima Grčke, što je bio početak epizootije BKK na području jugoistočne Evrope. Za manje od 4 meseca bolest je registrovana u Bugarskoj, Severnoj Makedoniji, R. Srbiji, Albaniji i Crnoj Gori (EFSA, 2016a, EFSA, 2016b). Prva pojava BKK u Bugarskoj zabeležena je u aprilu 2016. godine u pokrajini Blagoevgrad, koja se graniči sa Severnom Makedonijom i Grčkom. U Severnoj Makedoniji BKK se pojavila u aprilu 2016. godine u jugoistočnom delu zemlje, a zatim se proširila na teritoriju cele zemlje. U R. Srbiji prvi slučaj BKK je registrovan početkom juna meseca 2016. godine, u Albaniji krajem juna meseca 2016. godine, u Crnoj Gori u julu mesecu 2016. godine (EFSA, 2017).

Tokom 2017. godine javljali su se samo sporadični slučajevi bolesti u Severnoj Makedoniji (4 žarišta) i Grčkoj (2 žarišta), dok u drugim zemljama jugoistočne Evrope (izuzev Turske i

Albanije) nije bilo pojave bolesti. Albanija je bila jedina zemlja u jugoistočnoj Evropi u kojoj je tokom 2017. godine registrovan veliki broj žarišta BKK (379 žarišta) (Tuppurainen i sar., 2019).

2.3.3 Pojava BKK u Republici Srbiji

U R. Srbiji BKK je prvi put registrovana u junu 2016. godine u Pčinjskom okrugu na krajnjem jugu zemlje u opštini Bujanovac. Bolest je dijagnostikovana na osnovu praćenja epizootiološke situacije u regionu, kliničke slike i laboratorijskih ispitivanja (Vidanović i sar., 2016; Manić i sar., 2019). Tokom epizootije 2016. godine na području R. Srbije BKK se proširila na 11 okruga. Od ukupnog broja žarišta u R. Srbiji, 84% je registrovano na epizootiološkom području Veterinarskog specijalističkog instituta Niš (VSI Niš). Blagovremenim reagovanjem i primenom mera kontrole (stamping out, vakcinacija, dezinfekcija, dezinsekcija, kontrola kretanja životinja) epizootija je zaustavljena 1. oktobra 2016. godine. Celokupna populacija goveda je vakcinisana protiv BKK, a narednih godina sprovodila se revakcinacija i vakcinacija novorođenih životinja. Od 2016. godine kada je epizootija suzbijena na teritoriji R. Srbije nije zabeležen nijedan slučaj BKK (Manić i sar., 2019).

2.4 EPIZOOTIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESTI KVRGAVE KOŽE

Prirodni domaćini za virus BKK su domaća goveda (*Bos indicus* i *Bos taurus*) i azijski vodeni bivo (*Bubalus bubalis*). Dokazano je da su evropske rase goveda (*Bos taurus*) prijemčivije nego azijske rase (*Bos indicus*). Određena ispitivanja su pokazala da pojedine evropske rase goveda sa tankom kožom, poput Holštajn-frizijske rase, oboljevaju sa težim kliničkim simptomima bolesti od autohtonih afričkih rasa goveda (Coetzer, 2004). Postoje podaci koji ukazuju da od BKK mogu oboleti i neke vrste divljih preživara (Tuppurainen i Oura, 2012), međutim prijemčivost divljih preživara i njihova uloga kao potencijalnih rezervoara virusa nisu u potpunosti poznati. Prisustvo genoma virusa BKK utvrđeno je u kožnim čvorovima kod springbok antilope (*Antidorcas marsupialis*) (Lamien i sar., 2011a). Kod oriks antilope (*Oryx leucoryx*) je elektronskim mikroskopom utvrđeno prisustvo virusnih čestica CaPV u kožnim čvorovima, međutim nije dokazano da li se radilo o virusu BKK ili SPPV (Greth i sar., 1992). Prisustvo antitela na CaPV utvrđeno je kod nekih vrsta divljih preživara kao što su gnu (*Connochaetes taurinus*), belorepi gnu (*Connochaetes gnu*), eland antilopa (*Taurotragus oryx*), impala (Barnard, 1997) i afrički bivo (*Syncerus caffer*) (Davies, 1982). Prisustvo antitela protiv CaPV kod različitih životinjskih vrsta ukazuje na njihovu podložnost virusu, ali ne potvrđuje ulogu divljih životinja kao rezervoara i njihovu ulogu u prenošenju virusa. Međutim, praćenje toka infekcije, kao i utvrđivanje prisustva bolesti sa pojavom blagih kliničkih simptoma kod divljih preživara je problematično tako da ostaje sporno da li oni u prirodi oboljevaju. Smatra se da su zbog prirodne selekcije divlji preživari genetski otporniji na infekciju virusom BKK (Barnard, 1997).

Bolest kvrgave kože se klinički ispoljava kod svih starosnih kategorija i kod oba pola domaćih goveda. Prema nekim istraživanjima utvrđeno je da se bolest u težem obliku ispoljava kod muznih krava na vrhuncu laktacije kao i kod mlađih životinja (Coetzer, 2004). Iako neke studije ukazuju na veću osetljivost mlađih kategorija (Gari i sar., 2011), u određenim studijama nije utvrđena razlika u prevalenciji između različitih starosnih kategorija (Elhaig i sar., 2017). Ispitivanjem seroprevalencije BKK kod goveda različitih starosnih kategorija dokazano je da je seropozitivnost bila veća kod odraslih u poređenju sa mladim govedima (do 12 meseci starosti), što se objašnjava time da se telad drže u zatvorenim prostorima (Molla i sar., 2018; Abera i sar., 2015; Ochwo i sar., 2019). U studiji matematičkog modeliranja kojom se procenjuju različiti putevi prenošenja virusa BKK ispitivanja su pokazala da su telad na sisi ređe oboljevala zbog toga što se drže u zatvorenim prostorima udaljena od zaraženih životinja i zaštićena od insekata (Magori-Cohen i sar., 2012).

Prema dosadašnjim saznanjima BKK pripada grupi vektorski prenosivih bolesti pri čemu klimatski faktori, odnosno temperatura i količina padavina utiču na ciklus razmnožavanja

insekata u staništima uslovljavajući sezonsko pojavljivanje bolesti (Ochwo i sar., 2019). Na sezonsko pojavljivanje bolesti pored aktivnosti hematofagnih insekata utiče i način držanja, odnosno uzgoja životinja. Na području Balkana goveda se drže na tradicionalni način, tj. u poluotvorenom ili otvorenom sistemu, što omogućava kontakt sa vektorima, ali i kontakte životinja iz različitih stada. Tako je, na primer, u Grčkoj utvrđeno da je morbiditet BKK bio veći na farmama u kojima se životinje drže na ispaši, u odnosu na farme gde životinje ne koriste ispašu (Klement i sar., 2018).

Prema izveštajima iz zemalja u kojima se bolest pojavila u poslednjih nekoliko godina uočava se da brzina širenja, ukupna prevalencija kao i stope mortaliteta i letaliteta zavise od geografskog područja, klimatskih uslova, aktivnosti i brojnosti vektora, načina držanja stoke, rase goveda, imunskog statusa životinja i brzine sprovođenja mera kontrole bolesti (Sameea Yousefi i sar., 2017; Zeynalova i sar., 2016; Kasem i sar., 2018; Sprygin i sar., 2018a). U zemljama gde se BKK endemski javlja morbiditet se kreće od 5 do 45%, a mortalitet od 1 do 3%, izuzetno do 10% (Coetzer, 2018). Na područjima gde se bolest prvi put pojavljuje morbiditet može iznositi i 100% (Coetzer, 2004).

Iako je BKK jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti goveda, dinamika pojavljivanja, kao i putevi širenja nisu potpuno poznati. Utvrđeno je da se u enzootskim područjima bolest pojavljuje periodično, sa periodima između epizootija od nekoliko godina (Davies, 1991b). Nije poznato da li postoji specifični rezervoar virusa BKK, niti kako i gde virus preživljava između epizootija, ali je poznato da su prisustvo neimune populacije, brojnih hematofagnih vektora i kretanje životinja iz zaraženih regiona glavni pokretači opsežnih epizootija BKK (Tuppurainen i sar., 2017).

U epizootiološkoj studiji koja je obuhvatila period od pojave BKK u Turskoj (2015. godine) do pojave bolesti na Balkanskom poluostrvu (2016. godine) prikazan je stepen širenja BKK na Balkanskom poluostrvu. Zabeleženo je sezonsko širenje bolesti sa pikovima tokom letnjih perioda i prestankom bolesti tokom zime što se povezuje sa prestankom aktivnosti vektora. Uočena su područja sa većim brojem žarišta (tzv. *hot spots*) koja su uglavnom lokalizovana u pograničnim predelima. Prosečna brzina širenja BKK je bila 7,3 km/nedeljno (4,4 do 12,5 km/nedeljno), a najveća zabeležena brzina širenja BKK je bila 543,6 km/nedeljno. Ocenjeno je da je nizak stepen širenja BKK u određenim područjima povezan sa lokalnim prenosom uzročnika vektorima i eventualno direktnim kontaktom zaraženih i nezaraženih životinja, dok je visok stepen širenja BKK povezan sa kretanjima i trgovinom zaraženih životinja. Takođe, nije isključena verovatnoća da se bolest mogla širiti na veliku udaljenost nošenjem inficiranih vektora vetrom (Mercier i sar., 2018).

2.5 PRENOŠENJE VIRUSA

I pored činjenice da je od prvih izveštaja prošlo više od pola veka, putevi prenošenja virusa BKK još uvek nisu u potpunosti istraženi. Rani eksperimentalni radovi i opažanja sa područja južne Afrike doveli su do zaključka da je prenos virusa BKK sa inficiranih na zdrava goveda direktnim kontaktom moguć mada u retkim slučajevima i sa slabom efikasnošću (Weiss, 1968). Pored ovoga od značaja je indirektni prenos virusa posredstvom hrane i vode kontaminirane pljuvačkom ili nosnim iscedkom zaraženih životinja (Weiss, 1968; Tuppurainen i Oura, 2012).

Intrauterini prenos virusa BKK u poslednjoj trećini graviditeta je opisan nedavno (Rouby i Aboulsoud, 2016), a utvrđena je i mogućnost prenosa virusa sa majke na tele preko kontaminiranog mleka ili kožnih lezija na vimenu (Tuppurainen i sar., 2017). Eksperimentalno je dokazan prenos virusa veštačkim osemenjavanjem spermom zaraženih bikova, kao i embriotransferom. Virus BKK se dugo održava u pasemeniku i testisima (Annandale i sar., 2010), a moguće ga je izolovati iz sperme eksperimentalno inficiranih bikova i do 42 dana posle infekcije (Irons i sar., 2005). Ova istraživanja ukazuju da veštačku oplodnju i/ili prirodno parenje treba smatrati faktorima rizika za prenos virusa BKK. Međutim, malo je verovatno da bi se

visoka prevalencija infekcije mogla postići u stadima preko prirodnog parenja ili veštačke oplodnje (Annandale i sar., 2014).

Prenos virusa BKK kontaminiranim iglama korišćenim tokom vakcinacije se takođe navodi kao potencijalni način za širenje infekcije u stadu (Tuppurainen i sar., 2017).

Prema dostupnim izveštajima prenos putem artropoda predstavlja osnovni put prenosa virusa BKK. Smatra se da gotovo sve vrste hematofagnih insekata koje su prisutne na određenom području i hrane se na govedima mogu imati ulogu mehaničkih vektora (Kahana-Sutin i sar., 2017). Prvi slučaj pojave BKK na novim teritorijama je često posledica ilegalnog transporta goveda između farmi, regija ili zemalja. Prenos virusa BKK na veće udaljenosti odvija se kretanjem zaraženih životinja, ali i zaraženih vektora koji mogu uneti virus u populaciju goveda slobodnu od bolesti. Vektori - hematofagni insekti se mogu preneti na različite udaljenosti na tri načina i to: vetrom, transportnim sredstvima ili pticama. Spontana kretanja vektora imaju značaj u širenju bolesti samo na malim udaljenostima, zbog malog raspona kretanja insekata. Razdaljina prenošenja virusa je ekvivalentna tome koliko daleko određene vrste insekata mogu preleteti i to je najčešće 10-20 km. Hematofagni insekti za koje je utvrđeno da imaju ulogu vektora u prenošenju virusa BKK su muve (*Stomoxys calcitrans* i *Biomya fasciata*) (Weiss, 1968), komarci vrste *Aedes aegypti* (Chihota i sar., 2001) i krpelji vrste *Rhipicephalus sp.* i *Ambliomma sp.* (Tuppurainen i sar., 2013; Tuppurainen i sar., 2015a; Tuppurainen i sar., 2015b; Lubinga i sar., 2015).

Smatra se da transport vektora prevoznim sredstvima predstavlja rizik za prenošenje virusa na velike udaljenosti. *Stomoxys calcitrans* je jedna od najrasprostranjenijih vrsta insekata u različitim delovima sveta za koju je dokazano da može preneti poksviruse ovaca i koza (Rodhain, 2015), ali je takođe i važan vektor virusa BKK (Kahana-Sutin i sar., 2016). *S. calcitrans* se smatrao glavnim "krivcem" za prvu pojavu BKK u Izraelu u avgustu 1989. godine (Brenner i sar., 2006; Barnard i sar., 1994). Smatra se da *S. calcitrans* može imati važnu ulogu u prenošenju virusa i tokom transporta živih životinja prevoznim sredstvima, jer se duži vremenski period zadržava na glatkim površinama. Uloga drugih vrsta hematofagnih insekata u prenošenju virusa BKK na velike udaljenosti je sporna, kao što je slučaj sa vrstama iz roda *Tabanidae* imajući u vidu da ove vrste žive na otvorenom i ne ulaze u objekte ili prevozna sredstva (Saegerman i sar., 2018).

Dokazano je da ženke komarca *Aedes aegypti* mogu da prenesu virus BKK na prijemčive životinje 2 do 6 dana nakon hranjenja na eksperimentalno inficiranim životinjama (Chihota i sar., 2001). Međutim, pokušaji da se virus BKK prenosi između eksperimentalno inficiranih i prijemčivih goveda preko štalske muve *Stomoxys calcitrans Linnaeus*, komarčića *Culicoides nubeculosus Meigen* i dve vrste komaraca *Anopheles stephensi Liston* i *Culex quinquefasciatus Say* nisu bili uspešni bez obzira na to što je primenom molekularnih metoda dokazano da je koncentracija virusa u insektima bila dovoljno visoka da može da izazove infekciju kod prijemčivih životinja (Chihota i sar., 2003). Iako se trenutno osporava uloga *Culicoides spp.* kao vektora virusa BKK (Chihota i sar., 2003) određene studije ukazuju na njihov značaj, a dodatnim istraživanjima treba potvrditi navedene tvrdnje. Na osnovu istraživanja sprovedenim u Turskoj, genom virusa BKK je otkriven u *C. punctatus* što ukazuje na to da je on možda imao važnu ulogu u širenju virusa (Sevik i Dogan, 2017).

Na području juga R. Srbije rađena su malobrojna ispitivanja vezana za prisustvo različitih vrsta hematofagnih insekata. Jedna od retkih entomoloških studija koja se bavi ovom problematikom datira još iz 1996. godine u kojoj je na području južne Srbije dokazano prisustvo 12 vrsta komaraca iz subfamilije *Culicinae* i *Anophelinae* (tri iz roda *Culex*, sedam iz roda *Aedes* i jedan iz roda *Culiseta*) (Božičić-Lothrop i Vujić, 1996). Međutim, imajući u vidu trend pojave novih vektorski prenosivih bolesti na području R. Srbije, podaci o fauni hematofagnih insekata na ovom području su 2018. godine dopunjeni studijom koja je ukazala na prisustvo čak 22 vrste iz roda *Culicoides*, a čija je uloga u transmisiji virusa BKK generalno nepoznata (Vasić i sar.,

2018). Trenutno je veoma malo informacija o hematofagnim insektima koji su uključeni u širenje virusa na području Evrope.

U epizootiologiji BKK danas se sve veći značaj daje izučavanju uloge krpelja ne samo kao vektora, već i prirodnih rezervoara virusa. Dokaz o vertikalnom prenošenju virusa kod pojedinih vrsta krpelja može imati poseban značaj, zbog mogućnosti stacioniranja oboljenja na određenim područjima i dobijanja karaktera enzootije. Veći broj istraživanja dokazuje transovarijalni prenos virusa BKK kod ženki krpelja vrste *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* i *Rhipicephalus decoloratus* (Tuppurainen i sar., 2010; Lubinga i sar., 2014). Pored transovarijalnog kod navedenih vrsta krpelja dokazan je i transstadijalni prenos virusa BKK (Tuppurainen i sar., 2010; Lubinga i sar., 2015). Krpelji vrste *A. hebraeum* i *R. apendiculatus* mogu preneti virus BKK sa inficirane na prijemčive životinje i mehaničkim putem (Tuppurainen i sar., 2010). Tuppurainen i sar. (2013) su dokazali da i mužjaci krpelja *R. apendiculatus* imaju ulogu u mehaničkom prenošenju virusa BKK (Tuppurainen i sar., 2013). Iako su vrste krpelja čija je uloga u prenošenju virusa BKK dokazana prisutne na afričkom kontinentu i Bliskom Istoku (De Clercq i sar., 2012; Shoukry i sar., 1993), smatra se da usled uticaja globalnih klimatskih promena postoji rizik od širenja i stacioniranja navedenih vrsta na nova područja (Tuppurainen i sar., 2017).

Ispitivanjem faune krpelja na području juga Srbije utvrđeno je prisustvo devet vrsta krpelja iz roda *Ixodes* (*Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. sulcata*, *H. inermis*, *Hyalomma savignyi* i *Boophilus calcaratus*) (Milutinović i sar., 2012), čija je uloga u prenošenju virusa BKK nepoznata i zahteva dodatna ispitivanja.

2.6 KLINIČKA SLIKA BKK

Bolest kvrgave kože se može ispoljiti u akutnom, subakutnom i hroničnom toku. Period inkubacije kod eksperimentalno zaraženih životinja varira između četiri i sedam dana, dok kod prirodno inficiranih može trajati i do pet nedelja (Tuppurainen i sar., 2017). Nakon ulaska virusa u organizam domaćina, primarna replikacija se odvija u krvi i ćelijama kože, nakon čega virus limfom dospeva do regionalnih limfnih čvorova gde se dalje umnožava i izaziva primarnu viremiju, a zatim se širi u unutrašnje organe. Viremija kod BKK traje kratko, ali se kod životinja koje su eksperimentalno inficirane virus u krvi može dokazati molekularnim metodama do 15 dana (od 6 do 15 dana) nakon infekcije (Babiuk i sar., 2008a). Virus BKK se replikuje unutar ćelija domaćina kao što su makrofagi, fibroblasti, periciti i endotelne ćelije limfnih i krvnih sudova što dovodi do limfangitisa i vaskulitisa i ima za posledicu pojavu tromboze i infarkta koji uzrokuju edem i nekrozu tkiva (Prozesky i Barnard, 1982). Tropno tkivo za virus BKK je koža u kojoj nakon eksperimentalne infekcije virus može da ostane prisutan 42 dana (Babiuk i sar., 2008a). Koristeći protokol prema Ireland i Binopal (1998), Tuppurainen i saradnici (2005) su kod životinja eksperimentalno inficiranih virusom BKK otkrili genom virusa u uzorcima krvi najranije 2 dana posle infekcije (dpi), a najkasnije 28 dpi, dok je genom virusa BKK ovim protokolom detektovan u bioptatima kože čak do 92 dpi (Tuppurainen i sar., 2005).

Prvi znak infekcije je povišenje telesne temperature na 41°C koja može trajati približno nedelju dana (Tuppurainen i sar., 2005). Kod većine obolelih goveda limfni čvorovi, prvenstveno subskapularni i prefemoralni su vidljivo uvećani. Najvažniji klinički simptom kod inficiranih životinja je pojava karakterističnih čvorova na koži koji su izdignuti iznad površine kože, jasno ograničeni od zdrave kože, okrugli, čvrsti i bolni na dodir (Weiss, 1968, Tuppurainen i sar., 2005). Čvorovi su prečnika 10-50 mm, a njihov broj može da varira od nekoliko do nekoliko stotina u zavisnosti od težine kliničke slike (Tuppurainen i sar., 2017). Predilekciona mesta za pojavu čvorova su predeo glave, vrata, perineuma, vulve, skrotuma, vimena i nogu (Coetzer, 2004). Kod nekih životinja na sluzokoži konjunktiva, usne i nosne šupljine razvijaju se ulceracije koje su uzrok pojačane lakrimacije, salivacije i pojave iscetka iz nosa (Babiuk i sar., 2008a).

Nosni sekret je u početku serozan, a kasnije u zavisnosti od sekundarnih bakterijskih infekcija postaje mukozan ili mukopurulentan i sadrži relativno visoku koncentraciju virusa koji se izlučuje 12-18 dana nakon infekcije (Babiuk i sar., 2008a). U krajnjoj fazi bolesti čvorovi na koži nekrotizuju, pri čemu nekroza zahvata i potkožno i mišićno tkivo (Tuppurainen i sar., 2017). Kod nekih životinja se na ventralnim delovima tela razvija edem koji zahvata i vime pa posledično nastaje mastitis i prestanak laktacije. Takođe, dolazi do razvoja edema ekstremiteta, što je uzrok pojave hromosti. Kod gravidnih životinja može doći do pobačaja, a kod bikova do privremenog ili trajnog steriliteta (Carn i Kitching, 1995).

Bolest kvrgave kože se ponekad manifestuje blagim kliničkim simptomima pri čemu se može posumnjati na neke druge bolesti infektivne ili neinfektivne etiologije. Virusne infekcije koje se manifestuju sličnom kliničkom slikom kao BKK su infekcije parapoksvirusima (goveđi papularni stomatitis i lažne boginje), ortopoksvirusima (vakcinija i virus boginja goveda) i herpesvirusima (goveđi herpes virus 2) (Brenner i sar., 2009; Babiuk, 2018a, World Organisation for Animal Health (OIE), 2017). Klinička slika slična onoj kod BKK se javlja i kod fotosenzitivnosti, alergijskih reakcija, urtikarija i reakcija na ubod insekata ili krpelja. Neki paraziti, takođe mogu dovesti do pojave promena na koži goveda sličnih onima kod BKK, na primer uzročnik hipodermoze goveda (*Hypoderma bovis*), uzročnik onhocerkoze (*Onchocerca ochengi*) ili besnoitioze (*Besnoitia besnoiti*). Takođe, treba isključiti i neke bolesti bakterijske etiologije kao što su, na primer, kožni oblik tuberkuloze i pseudotuberkuloza (Babiuk, 2018a; World Organisation for Animal Health (OIE), 2017).

2.7 IMUNSKI ODGOVOR

Imunski odgovor na infekciju izazvanu virusima iz roda CaPV je prvenstveno ćelijski, međutim u odbrani organizma od CaPV takođe je značajna i uloga humoralnog imuniteta (Carn, 1993). Uloga ćelijskog imuniteta kod infekcije izazvane virusom BKK još nije u potpunosti ispitana, ali je opisana kod drugih bolesti izazvanih virusima iz familije *Poxviridae* (Babiuk, 2018b). Utvrđeno je da glavni protein omotača virusa (protein P32) poseduje neutralizacione i T ćelijske epitope i da učestvuje u imunskom odgovoru na infekcije izazvane CaPV kod sve tri prijemčive vrste životinja: goveda, ovaca i koza (Chand i sar., 1994). Imajući u vidu da CaPV (virus BKK, SPPV i GTPV) imaju podudarnost u redosledu nukleotida od 96% i zajednički glavni antigen za sintezu neutralizacionih antitela (Tulman i sar., 2001; Tulman i sar., 2002), postoje dokazi da virusi iz ovog roda stvaraju heterologni unakrsni zaštitni imunitet (Carn, 1993). Međutim, istraživanja su otkrila da je unakrsni imunitet stečen vakcinacijom nehomolognim vakcinama protiv CaPV samo delimičan na šta ukazuje činjenica da su u Etiopiji i Izraelu od BKK obolela goveda koja su bila vakcinisana vakcinom protiv boginja ovaca (Ayelet i sar., 2013; Tageldin i sar., 2014).

Utvrđeno je da se nakon vakcinacije životinja vakcinom protiv BKK specifična antitela razvijaju za 15 dana, a najviši nivo dostižu nakon 30 dana. Iako je kod BKK ćelijski imunski odgovor dominantan, detekcija humoralnog imunskog odgovora ima veći praktični značaj jer pruža značajne informacije o uspehu vakcinacije. Prema novijim istraživanjima sprovedenim nakon vakcinacije atenuiranim virusom protiv BKK dokazano je, da je detekcija specifičnih antitela protiv virusa BKK najranije moguća sedam do 14 dana nakon vakcinacije, a najkasnije do 40 nedelja nakon vakcinacije (Abdelwahab i sar., 2016), dok kod teladi koja potiču od vakcinisanih majki maternalni imunitet može da traje četiri do šest meseci (Carn, 1993).

2.8 PATOMORFOLOŠKI NALAZ

Najuočljivije patomorfološke promene kod BKK su promenjeni delovi kože, odnosno čvorovi koji ponekad zahvataju i subkutano i mišićno tkivo. Na poprečnom preseku čvorovi su čvrsti, beličasto-sive boje, okolno potkožno tkivo je često infiltrirano seroznom tečnošću, a kod starijih procesa (14 dana) usled ulceracije u centralnom delu čvorova nalazi se nekrotični sadržaj (OIE¹,

2018). Kod bikova čvorovi se mogu naći na koži skrotuma i repu epididimisa, a u tkivu testisa i epididimisa prisutna su područja zahvaćena nekrozom i infarktima (Annandale i sar., 2010).

Patohistološke promene značajno variraju u zavisnosti od forme bolesti. Kod akutne forme bolesti patohistološkim pregledom uočava se balonirajuća degeneracija ćelija epidermisa, folikulitis, furunkuloza i vaskulitis dermalnih kapilara, venula i arteriola (El-Neweshy i sar., 2012). Vaskulitis je praćen trombozom i infarktima u koži koji dovode do edema i nekroze. U promenjenim delovima kože prisutna je infiltracija makrofaga, limfocita i eozinofilnih granulocita (Coetzer, 2004). U epidermisu se uočava akantoza, parakeratoza i hipokeratoza, a kao posledica razlaganja nekrotičnih ćelija nastaje intercelularni edem i formiranje vezikula. Kod starijih procesa u epidermisu je prisutna perivaskularna fibroplazija i stvaranje ožiljnog tkiva (Prozesky i Barnard, 1982). U keratinocitima stratuma spinozum, ćelijama folikula dlaka i lojnim žlezdama nalaze se eozinofilne, homogene intracitoplazmatske inkluzije koje predstavljaju mesta umnožavanja virusa (Vasković i sar., 2019).

Limfni čvorovi su uvećani, a u nekim slučajevima su prisutni edemi ventralnih delova tela (Vasković i sar., 2019). Čest nalaz u limfnim čvorovima je limfoidna hiperplazija folikularne i interfolikularne zone, a u sinusima limfnih čvorova je prisutna infiltracija limfoblastima, limfocitima i makrofagima sa hipertrofijom i hiperplazijom retikuloendotelijalnih ćelija (Prozesky i Barnard, 1982).

Promene se mogu naći i na unutrašnjim organima i to u vidu hiperplazije sluzokože gornjih partija respiratornog sistema i usne šupljine, posledične hipersekrecije sluzi, pojave erozija i ulceracija sluzokože. Ponekad se kod životinja mogu razviti negnojna intersticijalna pneumonija i negojni meningoencefalitis (Prozesky i Barnard, 1982).

2.9 DIJAGNOSTIKA BKK

Dijagnostika BKK bazira se na praćenju epizootiološke situacije u zemlji i regionu, prepoznavanju kliničkih simptoma bolesti, analizi patomorfoloških nalaza i laboratorijskim ispitivanjima koja uključuju primenu direktnih metoda za otkrivanje virusa i indirektnih, seroloških metoda.

2.9.1 Laboratorijska dijagnostika BKK

Laboratorijska dijagnostika BKK goveda se zasniva na primeni klasičnih virusoloških, molekularnih i seroloških metoda. Virus BKK se može dokazati primenom elektronske mikroskopije, izolacijom virusa na kulturi tkiva i embrioniranim kokošnjim jajima, ili utvrđivanjem prisustva genoma virusa molekularnim metodama, odnosno metodom lančane reakcije polimeraze (*polymerase chain reaction - PCR*) (konvencionalni PCR) i lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*real-time polymerase chain reaction - real-time PCR*). Detekcija specifičnih antitela se zasniva na primeni virus neutralizacionog testa (VNT), indirektno imunofluorescencije (IFAT), agar gel imunodifuzionog testa (AGID), imunoenzimskog testa (*ELISA - enzyme linked immunosorbent assay*) i Western blota (OIE¹, 2018).

2.9.1.1 Izolacija virusa na kulturi ćelija

Za izolaciju virusa BKK mogu se koristiti primarne i kontinuirane kulture tkiva poreklom od goveda, ovaca i koza (Babiuk i sar., 2008a; OIE¹, 2018). Najprijemčivijim za izolaciju virusa se smatraju primarna ili sekundarna kultura tkiva jagnječeg testisa i kože goveda (Binopal i sar., 2001). Virus BKK se može izolovati i na horioalantoisnoj membrani pilećih embriona, pri čemu su najpodesniji embrioni stari 7 do 11 dana (El-Nahas, 2011). Uprkos činjenici da je vremenski zahtevnija od molekularnih metoda i da nije uvek uspešna, izolacija virusa BKK se primenjuje u dijagnostici bolesti naročito u zemljama gde se bolest prvi put javlja. U cilju izolacije virusa BKK mogu se koristiti kožni čvorovi koji sadrže visoke koncentracije virusa, ali i brisevi

sluzokože usta i nosa za koje je dokazano da predstavljaju jednako kvalitetan materijal za izolaciju virusa (Dietze i sar., 2018).

Umnožavanjem na kulturi ćelija virus BKK stvara citopatogeni efekat (CPE) koji se može uočiti već drugog dana nakon inokulacije materijala, ali retko se javlja nakon prve pasaže, najčešće u drugoj ili trećoj pasaži virusa. Prilikom umnožavanja na kulturi ćelija virus stvara intracitoplazmatske inkluzije koje se mogu detektovati bojenjem hematoksilin eozinom (Babiuk i sar., 2008a). Broj pasaža potrebnih za izolaciju virusa nije standardizovan niti određen, a prema literaturnim podacima varira od jedne do osam (Haegeman i sar., 2019).

2.9.1.2 Molekularne metode za dokazivanje genoma virusa BKK

Efikasna kontrola i rad na iskorenjivanju BKK u endemskim i ne-endemskim područjima zahteva brze i precizne dijagnostičke metode. Laboratorijske metode za dokazivanje prisustva virusa BKK zasnivaju se na primeni molekularnih i to konvencionalnih i real-time PCR metoda. U poređenju sa metodom izolacije virusa, prednost molekularnih metoda je u njihovoj visokoj osetljivosti, relativno brzom izvođenju, mogućnosti analize velikog broja uzoraka, upotrebi dobijenih rezultata u molekularnoj epizootiologiji, kao i ispitivanju uzoraka koji nisu podesni za izolaciju virusa (Tuppurainen i sar., 2005).

Osnove laboratorijske dijagnostike BKK primenom molekularnih metoda (PCR) postavljene su 1998. godine kada je objavljen prvi protokol za konvencionalni PCR kojim se može detektovati prisustvo genoma svih CaPV (SPPV, GTPV i virus BKK), a koji za ciljni region ima deo P32 gena (Ireland i Binopal, 1998). Poslednjih godina u literaturi su sve zastupljeniji naučni radovi koji se odnose na razvoj i primenu protokola za izvođenje PCR i real-time PCR metode kojima se mogu detektovati svi CaPV, razlikovati pojedini CaPV i razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK (Haegeman i sar., 2019). Protokoli za izvođenje real-time PCR metode za utvrđivanje prisustva genoma CaPV koji se baziraju na primeni specifičnih proba specifičniji su i osetljiviji od protokola za izvođenje PCR metode i istovremeno su lakši za primenu i tumačenje rezultata. Danas su najčešće u upotrebi hidrolitične (*TaqMan*) probe koje predstavljaju oligonukleotidnu sekvencu obeleženu sa fluorescentnom “odašiljač“ (*engl. reporter*) bojom na 5' kraju i “prigušivač“ (*engl. quencher*) bojom na 3' kraju. Jedan od prvih real-time PCR protokola sa *TaqMan* probom, kome je ciljni region ORF068, a kojim se mogu detektovati svi CaPV je protokol prema Balinsky i sar. (2008). Real-time PCR protokol koji je našao široku primenu u dijagnostici BKK kojim se takođe mogu detektovati svi CaPV, a kome je ciljni region deo gena P32 je protokol prema Bowden i sar. (2008) (Bowden i sar., 2008). Protokol prema Bowden i sar. (2008) validovan je od strane Stubbs i sar. (2012), a uporednim ispitivanjem uzoraka protokolom prema Bowden i sar. (2008) i protokola za konvencionalni PCR prema Ireland i Binopal (1998) dokazana je veća osetljivost protokola prema Bowden i sar. (2008) (analitička osetljivost 10 kopija DNK virusa po reakciji) (Stubbs i sar., 2012). S obzirom da se njime detektuju svi CaPV, protokol prema Bowden i sar. (2008) se može primenjivati u dijagnostici BKK u državama gde boginje ovaca i koza nisu prisutne i ne sprovodi se vakcinacija protiv BKK (Haegeman i sar., 2019). Osnovni nedostatak protokola prema Bowden i sar. (2008) sa kojim su se suočavale države koje su sprovodile dijagnostiku je nemogućnost razlikovanja terenskog od vakcinalnog soja virusa BKK.

U državama u kojima su prisutne boginje ovaca i koza, a ne sprovodi se vakcinacija protiv BKK neophodno je da se za dijagnostiku BKK koriste PCR protokoli kojima je moguće razlikovati virus BKK od virusa boginja ovaca i koza. U te svrhe mogu se koristiti protokoli za izvođenje PCR (Heine i sar., 1999; Lamien i sar., 2011a; Sameea Yousefi i sar., 2017) ili real-time PCR metode (Lamien i sar., 2011b; Gelaye i sar., 2013, Sprygin i sar., 2019b), pri čemu se protokoli za izvođenje real-time PCR metode češće koriste. Dva protokola koja su našla primenu tokom epizootije BKK 2016. godine su protokoli za izvođenje real-time PCR metode opisani od strane Lamien i sar. (2011b) i Gelaye i sar. (2013) (Sevik i Dogan, 2017; Agianniotaki i sar., 2017b). U ovim protokolima se koriste hibridizacijske FRET (*engl. Fluorescence Resonance Energy*

Transfer) probe, pri čemu je ciljani region probe protokola prema Lamien i sar. (2011b) deo GPCR gena, a ciljani region probe protokola prema Gelaye i sar. (2013) je deo RPO30 gena (Lamien i sar., 2011b; Gelaye i sar., 2013). S obzirom da se u Ruskoj Federaciji ne sprovodi vakcinacija protiv BKK, u cilju razlikovanja virusa BKK od ostalih CaPV Sprygin i sar. (2019b) su razvili protokol za izvođenje real-time PCR metode kojim se detektuje samo genom virusa BKK (terenskog i vakcinalnog) čime je omogućeno razlikovanje virusa BKK od SPPV i GTPV. *TaqMan* proba ovog protokola je zasnovana na razlikama u redosledu nukleotida (*mismatches*) na delu gena LSDV044 virusa BKK i CaPV (SPPV i GTPV) (Sprygin i sar., 2019b).

Imajući u vidu da prema dostupnim podacima postoji mogućnost pojave blage ili sistemske reakcije kod životinja nakon aplikacije vakcine, neophodno je imati razvijenu dijagnostičku proceduru kojom se mogu razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK. U te svrhe može se primenjivati protokol za izvođenje nested PCR metode u kombinaciji sa restrikcijom enzimskim razlaganjem proizvoda koji je razvijen na osnovu delecije od 27 bp na EEV genu na poziciji 116363 vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa BKK u odnosu na terenski soj (Menasherow i sar., 2014). Osim pomenutog nested PCR protokola koji je komplikovan i dugotrajan za izvođenje, Menasherow i sar. (2016) su na osnovu razlike na EEV genu kod vakcinalnog soja virusa razvili i protokol za izvođenje real-time PCR metode koji nije našao široku primenu u dijagnostici. Koristeći razlike na EEV genu razvijeni su i protokoli za izvođenje real-time PCR metode kojima se mogu detektovati samo terenski sojevi virusa BKK (Vidanović i sar., 2016; Pestova i sar., 2018). U Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za kapripoksviruse R. Srbije (NRL za kapripoksviruse) u Veterinarskom specijalističkom institutu Kraljevo (VSI Kraljevo) tokom trajanja epizootije BKK razvijen je KV-2 protokol, dok je u institutu Friedrich-Loeffler u Nemačkoj razvijen FLI protokol kojima se mogu detektovati samo terenski sojevi virusa BKK, pri čemu oba protokola imaju istu analitičku osetljivost (0,2 TCID₅₀/ml) (Vidanović i sar., 2016).

Tokom trajanja epizootije BKK u Grčkoj razvijen je protokol za izvođenje real-time PCR metode kojim se mogu razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa (DIVA protokol), a prajmeri i probe dizajnirani su na osnovu delecije od 12 bp u GPCR genu kod terenskog soja virusa (Agianniotaki i sar., 2017b; Agianniotaki i sar., 2017c). Takođe, Sprygin i saradnici su razvili protokol za izvođenje real-time PCR metode za detekciju samo vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa kojim se detektuje deo LSDV008 gena vakcinalnog soja virusa (od pozicije 5372 do 5445 u genomu *Neethling* soja LW 1959), dok kod terenskog soja virusa zbog razlike u redosledu nukleotida (*mismatches*) ne dolazi do vezivanja probe (Sprygin i sar., 2018c). Osim navedenih protokola dostupni su i komercijalni real-time PCR testovi za detekciju genoma CaPV (EFSA, 2018b).

Rezultati istraživanja Sprygin i sar. (2018b) pokreću važna pitanja vezana za koncept DIVA i tačnost filogenetske analize. Utvrđivanje novog soja virusa na području Ruske Federacije (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) za koji je dokazano da je rekombinantni zahteva pripremu i standardizaciju adekvatnih protokola za njihovu tačnu identifikaciju. I pored velikog broja real-time PCR protokola koji se mogu koristiti za identifikaciju vakcinalnih i terenskih sojeva virusa u slučaju novog soja primenjenim testovima dobijaju se diskutabilni rezultati. Ispitivanja ovog soja protokolom koji je standardizovan u Grčkoj, a koji se zasniva na razlici u GPCR genu (Agianniotaki i sar., 2017b), zatim nested PCR protokolom zasnovanom na deleciji od 27 bp u EEV genu vakcinalnog soja virusa BKK (Menasherow i sar., 2014), kao i protokolima KV-2 (Vidanović i sar., 2016) i protokolom prema Pestova i sar., (2018) koji se takođe zasnivaju na razlici od 27 bp u EEV genu, pokazala su da je u pitanju vakcinalni soj virusa. Ovo nije potvrđeno nakon filogenetske analize koja je pokazala da je ovaj soj verovatno posledica rekombinacije između terenskih i vakcinalnih sojeva, čime je našao svoje mesto u posebnoj podgrupi. Upravo trenutna nemogućnost identifikacije ovakvih sojeva koji se u prirodnim uslovima umnožavaju mogu predstavljati opasnost od daljeg širenja BKK i pojave teške kliničke slike.

2.9.1.3 Sekvenciranje genoma virusa BKK

Poslednjih godina u dijagnostici virusa BKK pored metode lančane reakcije polimeraze (PCR), u cilju detaljne molekularne identifikacije sekvence izolovanog i/ili identifikovanog virusa sve više je u upotrebi i direktno sekvenciranje PCR proizvoda. Analizom redosleda nukleotida delova gena virusa dobijaju se informacije koje su važne za razlikovanje virusa BKK od SPPV i GTPV. Prema literaturnim podacima u cilju filogenetske analize virusa BKK najčešće se koriste sekvence četiri gena (RPO30, GPCR, EEV i P32) prema kojima se virus BKK može razlikovati od virusa boginja ovaca i koza (Lamien i sar., 2011a; Lamien i sar., 2011b; Le Goff i sar., 2009, Gelaye i sar., 2015; Babiuk, 2018a).

U međunarodnoj bazi podataka - banci gena (*NCBI GenBank*) dostupne su 14 sekvence celog genoma virusa BKK, i to iz Grčke (*Evros/GR/15*) (Agianniotaki i sar., 2017a), Srbije (*Serbia/Bujanovac/2016*) (Toplak i sar., 2017), Ruske Federacije (*LSDV/Russia/Dagestan/2015*) (Sprygin i sar., 2019a) i (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) (Sprygin i sar., 2018b), Južne Afrike (*Neethling Warmbaths LW*) (Kara i sar., 2003), Izraela (*155920/2012*), *Neethling* soj (*NI-2490*) izolovan u Keniji 1958. godine (Tulman i sar., 2001), *KSGP 0240* soj (Vandenbussche i sar., 2016), kao i nekoliko vakcinalnih sojeva: virus BKK soj *Neethling-Herbivac vaccine*, virus BKK soj *SIS-Lumpyvax vaccine*, virus BKK soj *Neethling-LSD vaccine-OBP* (Mathijs i sar., 2016), virus BKK izolovan u Hrvatskoj (*Cro2016*) (Lojkić i sar., 2018) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

Pojava epizootije BKK na područje Bliskog Istoka i jugoistočne Evrope, bila je razlog da se u mnogim zemljama gde je došlo do pojave bolesti uradi izolacija virusa i sprovede filogenetska analiza dobijenih izolata. Grčka je prva zemlja jugoistočne Evrope u kojoj je urađena izolacija virusa i sekvenciranje celog genoma. Filogenetskom analizom utvrđeno je da virus BKK izolovan u Grčkoj (*Evros/GR/15*) ima podudarnost u redosledu nukleotida od 100% sa sojem virusa BKK iz Turske (*LSD/Sivas/0114/TUR*). Upoređivanjem delova genoma (u području tri gena GPCR, RPO30 i EEV) izolata *Evros/GR/15* sa vakcinalnim sojevima virusa (*Neethling* i *SIS* soj) koji su korišćeni za vakcinaciju utvrđeno je da grčki terenski soj virusa ima 12 bp manje u delu GPCR gena (Agianniotaki i sar., 2017b).

Poređenjem celog genoma virusa BKK izolovanog na području R. Srbije (*Serbia/Bujanovac/2016*) sa celim genomima drugih CaPV iz različitih delova sveta utvrđena je najveća podudarnost u redosledu nukleotida od 99,99% sa sojem izolovanim u Grčkoj (*Evros/GR/15*) i 99,95% sa sojem izolovanim u Južnoj Africi (*Neethling Warmbaths LW*). U genomu virusa *Serbia/Bujanovac/2016* identifikovana je delecija od 15 nukleotida u nekodirajućem delu invertovanog terminalnog ponavljanja. Utvrđeno je da se genom virusa izolovanog u Srbiji razlikuje od južnoafričkog soja u 12 modifikacija aminokiselina (Toplak i sar., 2017).

Dokazano je da virus BKK izolovan tokom epizootije BKK 2015. godine u Ruskoj Federaciji (*LSDV/Russia/Dagestan/2015*) ima najveću podudarnost u redosledu nukleotida od 99,9% sa virusom BKK izolovanim u Srbiji (*Serbia/Bujanovac/2016*) i Grčkoj (*Evros/GR/15*), kao i podudarnost u redosledu nukleotida od 99,8% sa sojem izolovanim u Južnoj Africi (*Neethling Warmbaths LW*) (Sprygin i sar., 2018a). Nakon sprovođenja mera imunoprofilakse 2017. godine u Ruskoj Federaciji izolovan je još jedan soj virusa BKK (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) za koji je nakon sekvenciranja celog genoma utvrđeno da se radi o rekombinantnom virusu. Pored visokog stepena konzerviranosti genoma virusa BKK istraživanja u Ruskoj Federaciji su pokazala da ipak postoji mogućnost rekombinacije (Sprygin i sar., 2018b).

2.9.1.4 Serološka dijagnostika BKK

Iako serološki testovi imaju veliki značaj u dijagnostici, u slučaju BKK njima se od uvek posvećuje manja pažnja zbog dominacije imunskog odgovora koji je uglavnom ćelijski posredovan (Haegeman i sar., 2019). Serološki testovi su našli primenu u retrospektivnim istraživanjima prisustva BKK na nivou zapata, kao i u praćenju imunskog statusa životinja nakon vakcinacije protiv BKK (EFSA, 2015).

U serološkoj dijagnostici BKK virus neutralizacioni test se smatra standardom. Nedostaci ovog testa su rad sa živim virusom što predstavlja ograničenje za upotrebu u zemljama u kojima BKK nije prisutna, mali broj uzoraka koji se mogu pregledati, kao i varijabilna osetljivost testa (70% do 96%) (Babiuk i sar., 2008b; Babiuk i sar., 2009; OIE¹, 2018). Osim VNT, u serološkoj dijagnostici se koristi AGID test, s tim što je kod ovog testa dokazano da postoji unakrsna reakcija sa antitelima nastalim kod infekcije virusima iz roda *Parapoxvirus* (Bowden i sar., 2009). Jedina serološka metoda koja ima zadovoljavajuću specifičnost i osetljivost je Western blot. Međutim, složenost u izvođenju, kao i cena koštanja su razlog zašto se imunoblot ne koristi u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici (Chand i sar., 1994; OIE¹, 2018). Do sada je opisano nekoliko ELISA testova za detekciju antitela, ali prema dijagnostičkom protokolu OIE-a, nijedan ELISA test još uvek nema preporuku za širu upotrebu (OIE¹, 2018). Babiuk i sar. (2009) razvili su ELISA test u kome su kao antigen koristili kompletan inaktivisani virus boginja ovaca, pri čemu je utvrđeno da je osetljivost ELISA testa bila niža (88%) u odnosu na VNT (Babiuk i sar., 2009). Od nedavno je na tržištu dostupan komercijalni ELISA test za detekciju specifičnih antitela protiv CaPV (*ID Screen[®] Capripox double antigen Multi-species-ELISA test*, IDvet, Francuska) koji ima specifičnost od 99,7%. Istraživanja sprovedena u Srbiji su pokazala da je specifičnost navedenog komercijalnog ELISA testa bila 99,2% (Samojlović i sar., 2019).

2.10 MERE KONTROLE I ERADIKACIJE BOLESTI

Mere kontrole i iskorenjivanja BKK zasnivaju se na ranom otkrivanju bolesti, primeni *stamping out* metode (eutanazija bolesnih životinja), ograničenju ili potpunoj zabrani kretanja životinja, kontroli vektora i vakcinaciji (Tuppurainen i sar., 2018b). Mere kontrole BKK preporučene su od strane OIE-a, World Organisation For Animal Health, Terrestrial animal health code, 2011. Nakon pojave BKK na teritoriju Evrope donešene su nove direktive kojima je omogućeno da države koje su slobodne od BKK, a imaju zajedničke granice sa državama u kojima je bolest registrovana, mogu da započnu vakcinaciju bez značajnog uticaja na trgovinu životinjama (Tuppurainen i sar., 2018b).

Tokom epizootije 2016. godine u R. Srbiji se BKK suzbijala prema propisima Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (Ministarstvo) koji su usaglašeni sa evropskim direktivama (Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d), pri čemu se epizootiološkom jedinicom smatrala farma, odnosno individualno gazdinstvo.

Usled pojave BKK R. Srbija je kao i sve balkanske zemlje uvela zabranu kretanja životinja, *stamping out*, kontrolu vektora i vakcinaciju po hitnom postupku. Vakcinacija cele populacije goveda je do kraja 2016. godine bila završena u Bugarskoj, R. Srbiji, Crnoj Gori i Severnoj Makedoniji, dok u Grčkoj i Albaniji do kraja 2016. godine nije bila vakcinisana cela populacija goveda. Hrvatska je bila jedina zemlja u regionu u kojoj nije bilo slučajeva BKK, ali je sprovedena vakcinacija cele populacije goveda.

Balkanske zemlje su imale različit pristup u sprovođenju *stamping out* metode. U Grčkoj i Bugarskoj je tokom trajanja epizootije (i nakon sprovedene vakcinacije) primenjivan potpuni *stamping out*, odnosno eutanazirana su bila sva goveda u gazdinstvu gde se bolest pojavila. U Severnoj Makedoniji i pre i nakon sprovedene vakcinacije bila su eutanazirana samo goveda koja su imala kliničke simptome BKK i kod kojih je laboratorijskim pregledom utvrđeno prisustvo

genoma virusa. Na teritoriji Kosova i u Albaniji *stamping out* nije bio primenjivan. U R. Srbiji i Crnoj Gori je primenjivan potpuni *stamping out* sve do uvođenja vakcinacije, međutim, nakon vakcinacije eutanazija se sprovodila samo na životinjama sa ispoljenim kliničkim simptomima (EFSA, 2017).

Imajući u vidu da je BKK vektorski prenosiva bolest, u suzbijanju BKK primenjivana je dezinsekcija i kontrola vektora. Za razliku od dostupnih podataka o rezultatima u kontroli BKK koji su postignuti vakcinacijom i *stamping out* metodom, ne postoje podaci koji pokazuju da je upotreba insekticida bila efikasna. Svakako da je upotreba efikasnih insekticida doprinela kontroli BKK jer je uticala na smanjenje broja insekata i ubadanje životinja što može imati uticaj na verovatnoću infekcije, međutim, ove podatke je uvek teško retrospektivno dokumentovati (EFSA, 2015).

2.10.1 Vakcinacija

Vakcinacija je najefikasniji način kontrole BKK u zemljama gde se bolest endemski javlja (Tuppurainen i sar., 2014). Imajući u vidu da postoji unakrsni imunitet između CaPV, u kontroli i suzbijanju BKK pored vakcina napravljenih od atenuiranog *Neethling* soja mogu se koristiti i vakcine napravljene od atenuiranih sojeva SPPV i GTPV. Za vakcinaciju goveda protiv BKK na tržištu postoje homologne (sadrže *Neethling* soj virusa BKK ili soj *KSGP 0240*) i heterologne vakcine (sadrže virus SPPV soj *RM65* ili *Romanian* ili *Gorgan* virus GTPV) (Kitching, 2003; Gari i sar., 2015). Ukoliko se BKK javi u regionima u kojima boginje ovaca i koza nisu prisutne, u cilju vakcinacije životinja protiv BKK mogu se koristiti samo atenuirane homologne vakcine (Tuppurainen i Oura, 2012), dok se u regionima gde su boginje ovaca i koza prisutne mogu pored homolognih koristiti i heterologne vakcine (Brenner i sar., 2009; Davies, 1991b; EFSA, 2015). Inaktivisana vakcina se u praksi retko primenjuje, a može se smatrati kratkoročnim rešenjem u hitnim slučajevima kod pojave BKK (Tuppurainen i Oura, 2012).

Kako bi se tokom 2016. godine širenje BKK zaustavilo u zemljama Balkanskog poluostrva neophodno je bilo što pre vakcinisati kompletnu populaciju goveda. Obzirom da u većini balkanskih zemalja boginje ovaca i koza nisu prisutne, vakcinacija goveda protiv BKK je sprovedena atenuiranom vakcinom koja sadrži *Neethling* soj virusa BKK. Analiza rezultata sprovedene vakcinacije u šest balkanskih zemalja (Bugarska, Grčka, R. Srbija, Crna Gora, Severna Makedonija i Albanija) i faktora rizika za infekciju virusom BKK na nivou farmi su pokazali prosečnu efikasnost vakcinacije na Balkanu od 79,8% pri čemu je najniža efikasnost bila u Albaniji (62,5%), a najviša u Bugarskoj i R. Srbiji (više od 97%). Kod vakcinisanih životinja imunitet se je razvijao prosečno za 14 dana, a pojava bolesti izazvane vakcinalnim sojem virusa BKK nije primećena (Klement i sar., 2018).

2.10.2 Postvakcinalne komplikacije

Prema dosadašnjim ispitivanjima utvrđeno je da imunizacija goveda protiv BKK živim atenuiranim vakcinama može dovesti do neželjenih reakcija (opisane u literaturi kao "bolest *Neethlinga*"), koje se mogu ispoljiti od blagih sistemskih reakcija do pojave karakterističnih promena na koži (čvorova), pada mlečnosti, smanjenja apetita, povišenja telesne temperature, pobačaja i drugih promena (Ben-Gera i sar., 2015; Abutarbush i sar., 2016; Katsoulos i sar., 2017; Bedeković i sar., 2018).

Na području Evrope korišćene su homologne vakcine protiv BKK, a do sada nisu zvanično prijavljeni slučajevi izbivanja bolesti izazvane vakcinalnim sojem virusa. U Hrvatskoj izolovan je i sekvenciran vakcinalni soj virusa BKK iz uzoraka od životinje kod koje se razvila kožna reakcija nakon vakcinacije. Rezultati sekvenciranja potvrdili su da je genom vakcinalnog soja virusa nakon pasaže kroz organizam vakcinisanih goveda ostao stabilan i 100% identičan originalnom vakcinalnom soju virusa (Lojkić i sar., 2018).

Primenom DIVA PCR protokola u Grčkoj tokom epizootije BKK 2016. godine prisustvo vakcinalnog soja virusa BKK dokazano je samo u 1,3% od ukupnog broja žarišta (Antoniou i sar., 2017). Katsoulos i saradnici su opisali neželjene reakcije nakon vakcinacije na jednoj farmi Holštajn-frizijske rase goveda u Grčkoj gde su se kod 9% vakcinisanih životinja razvili netipični čvorovi na koži koji su bili znatno manji i površniji od čvorova kod prirodne infekcije (Katsoulos i sar., 2017). Tokom epizootije BKK 2016. godine u Bugarskoj, Crnoj Gori i Albaniji bolest se javljala u vakcinisanim stadima, ali iako su laboratorijske analize prikupljenih uzoraka potvrdile prisustvo virusa BKK, nije izvršeno testiranje da li je u pitanju terenski ili vakcinalni soj virusa BKK, odnosno nije utvrđeno da li je bolest bila posledica primene vakcine ili su životinje prilikom vakcinacije već bile u inkubaciji (Tuppurainen i sar., 2019).

Problem koji se pojavljuje kod postvakcinalnih komplikacija je nemogućnost razlikovanja inficiranih od vakcinisanih životinja, međutim jedino rešenje ovog problema je upotreba DIVA vakcina i razvijanje i standardizacija DIVA molekularnih testova za dijagnostiku (Tuppurainen i Oura, 2012).

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da se BKK pojavila prvi put na teritoriji R. Srbije 2016. godine, cilj ove doktorske disertacije bila je epizootiološka analiza epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš, izolacija i identifikacija virusa BKK, sekvenciranje dela genoma identifikovanih i izolovanih virusa BKK i molekularno epizootiološka analiza dobijenih podataka. S obzirom na veliki značaj molekularnih metoda u ranoj dijagnostici BKK cilj je bio priprema i validacija real-time PCR protokola za dokazivanje terenskog soja virusa, upoređivanje sa već dostupnim, i definisanje najpouzdanijeg (najspeficijalnijeg i najosetljivijeg) protokola za dokazivanje prisustva virusa BKK. Uzimajući u obzir i problem u razlikovanju vakcinalnog od terenskog soja virusa cilj ove doktorske disertacije je bio i priprema i validacija real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK u kliničkim uzorcima.

Imajući u vidu navedene ciljeve postavili smo sledeće zadatke:

1. Prikupljanje i sistematizacija epizootioloških podataka na lokalitetima izbijanja BKK na epizootiološkom području VSI Niš.
2. Prikupljanje uzoraka (puna krv, bioptati kože i nosni brisevi) od nevakcinisanih goveda sa kliničkim simptomima bolesti.
3. Prikupljanje uzoraka (puna krv, bioptati kože i nosni brisevi) od vakcinisanih goveda sa kliničkim simptomima.
4. Izolacija virusa BKK iz kliničkih uzoraka na kulturi ćelija, utvrđivanje titra izolovanog virusa i njegova identifikacija primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i reakcijom virus neutralizacije (VNT).
5. Ispitivanje prisustva genoma virusa BKK u prikupljenim uzorcima primenom protokola za izvođenje metode real-time PCR i nested PCR protokola uz korišćenje odgovarajućih oligonukleotidnih prajmera i proba.
6. Utvrđivanje redosleda nukleotida u delu genoma detektovanih i izolovanih virusa BKK primenom metode direktnog sekvenciranja.
7. Upoređivanje sekvenci izolovanih i identifikovanih virusa BKK iz uzoraka goveda poreklom sa teritorije R. Srbije sa nukleotidnim sekvencama referentnih sojeva i izolata virusa iz drugih delova sveta koje se nalaze u međunarodnoj bazi podataka - banci gena (*NCBI GenBank*) u cilju utvrđivanja porekla virusa kod goveda na području R. Srbije.
8. Priprema i validacija novog real-time PCR protokola za detekciju terenskog soja virusa BKK.
9. Priprema i validacija novog real-time-PCR protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK.
10. Ispitivanje prisustva genoma vakcinalnog soja virusa u kliničkim uzorcima poreklom od vakcinisanih goveda sopstveno pripremljenim real-time PCR protokolom.
11. Izrada epizootiološke karte, mapiranje epizootije sa utvrđenom prevalencijom oboljenja i ispitivanje učestalosti kliničkih simptoma kod goveda posle vakcinacije, na epizootiološkom području VSI Niš.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 IZOLACIJA VIRUSA BOLESTI KVRGAVE KOŽE

4.1.1 Uzorci za izolaciju

Za izolaciju virusa BKK korišćeno je 10 bioptata kože uzorkovanih od goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima pre vakcinacije u kojima je prethodno molekularnim metodama dokazano prisustvo virusa BKK. Uzorci su sakupljeni tokom epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš. Izolacija virusa urađena je u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za kapripoksviruse R. Srbije - VSI Kraljevo (NRL).

4.1.2 Materijal za izolaciju virusa i izvođenje testa virus neutralizacije

Za izolaciju virusa i virus neutralizacioni test korišćeni su:

- virus BKK - soj *Serbia/Bujanovac/2016* (vlasništvo Naučnog instituta za veterinarstvo Novi Sad);
- kontinuirana ćelijska linija - MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*, ATCC-CCL22) (LGC Standards, Engleska);
- podloga za rast i održavanje ćelijske linije - minimalni esencijalni medijum (MEM) (Sigma, SAD, lot: SLBQ2618V);
- fetalni goveđi serum (*fetal bovine serum - FBS*) (Capricorn Scientific, Nemačka);
- penicilin i streptomycin (Sigma, SAD);
- sterilne mikrotitar ploče za kulturu ćelija sa ravnim dnom sa 6 i 96 bazenčića (Sarstedt, Nemačka).

Za izolaciju virusa i virus neutralizacioni test korišćena je sledeća oprema: invertni mikroskop (Olympus, Japan), inkubator (Mettler, Nemačka), laminarna komora (Faster, Italija), centrifuga (Eppendorf, Nemačka), vodeno kupatilo (Mettler, Nemačka), vorteks mešalica (Biosan, Letonija), frižider (Gorenje, Srbija), zamrzivač na -20°C (Gorenje, Srbija), automatske višekanalne i jednokanalne mikropipete i električni pipetor (Eppendorf, Nemačka).

4.1.3 Priprema uzoraka za izolaciju virusa

Bioptati kože su prvo iseckani sterilnim makazama na sitne komade u količini od oko 20mg, i stavljeni u sterilnu epruvetu sa sterilnim staklenim perlicama i PBS. Odnos materijal/PBS bio je 1:9 (jedan deo tkiva i devet delova PBS). Materijal je zatim homogenizovan na vorteksu i centrifugovan na 2000 g tokom 10 minuta. Nakon centrifugiranja materijal je filtriran kroz bakterijski filter sa promerom pora od 0,45 nm.

4.1.4 Izolacija i identifikacija virusa

U pločama za rast kulture ćelija sa 6 bazenčića (Sarstedt, Nemačka), u svaki bazenčić razliveno je po 3,0 ml suspenzije ćelijske linije MDBK (oko 10^5 ćelija/ml) (ATCC-CCL22) (LGC Standards, Engleska) u podlozi MEM (Sigma, SAD) sa 10% FBS (Capricorn Scientific, Nemačka) i mešavinom antibiotika (penicilin i streptomycin) (Sigma, SAD). Posle inkubiranja tokom 24 sata na temperaturi od 37°C podloga je odlivena i po 0,3 ml pripremljenog uzorka je inokulisano na sloj umnoženih ćelija (MDBK, Standards, Engleska). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Serbia/Bujanovac/2016* koji je inokulisan u dva zasebna bazenčića, dok su dva bazenčića u kojima se nalazila samo kultura ćelija predstavljala negativnu kontrolu. Posle 60 minuta, u svaki bazenčić u koji je inokulisan ispitujući materijal dodato je još 3,0 ml medijuma

za rast ćelija, nakon čega su ploče inkubirane na temperaturi od 37°C tokom 7 dana. Inokulisane kulture ćelija su svakodnevno ispitivane mikroskopski (Olympus, Japan), na prisustvo citopatogenog efekta (CPE). Mikroplоче su inkubirane dok citopatogeni efekat (CPE), odnosno pozitivan nalaz na prisustvo i umnožavanje izolovanog virusa, nije zahvatio 75% ćelija, nakon čega je kultura sa umnoženim virusom zamrzavana na -20°C. Pojava CPE u prva 24h smatrana je nespecifičnom (i po pravilu je posledica toksičnog dejstva inokulisanog materijala). Kulture ćelija sa inokuliranim uzorcima u kojima nije došlo do pojave CPE u prvoj pasaži nakon 7 dana su podvrgnute subkultivaciji, odnosno tzv. slepim pasažama, tako što su ploče 3 puta zamrzavane i odmrzavane, a zatim je sadržaj ploče prebacivan u tubice sa V dnom (Eppendorf, Nemačka) i centrifugiran na 2000 g tokom 2 minuta. Dobijeni supernatant u količini od 0,3 ml je inokulisan na novu ćelijsku liniju staru 24 sata po već opisanom postupku. Uzorci koji nisu doveli do pojave CPE posle treće slepe pasaže su proglašavani negativnim na prisustvo virusa BKK. Uzorci kultura ćelija u kojima je došlo do pojave CPE, su ispitivani molekularnim metodama (real-time PCR) i virus neutralizacijom (VNT) u cilju identifikacije izolovanog virusa.

4.1.4.1 Titracija virusa

Titracija izolovanog virusa BKK urađena je u odeljenju za virusologiju u Naučnom institutu za veterinarstvo Novi Sad. U cilju određivanja titra izolovani virus je razblažen u podlozi za rast kulture ćelija MEM (Sigma, SAD) i titriran u desetostrukim razređenjima (od 10^{-1} do 10^{-8}). Svako razređenje virusa u količini od 100 μ l je sipano u 8 bazenčića mikrotitar ploče sa 96 bazenčića (Sarstedt, Nemačka) a zatim je dodavano po 100 μ l suspenzije kulture ćelija MDBK (ATCC-CCL22) (LGC Standards, Engleska) (koncentracije 30000 ćelija/ml). Mikrotitar ploče su inkubirane na temperaturi od 37°C u trajanju od 5 dana i svakodnevno kontrolisane mikroskopski na pojavu CPE (Olympus, Japan). Kao negativna kontrola prisustva virusa korišćena je suspenzija ćelija MDBK dodata u istoj količini u 16 bazenčića mikrotitar ploče. Kao pozitivan nalaz na prisustvo virusa BKK uzimani su bazenčići mikrotitar ploče sa inokuliranim različitim razređenjima virusa u kojima je kao posledica umnožavanja virusa procenat ćelija zahvaćenih CPE bio veći od 50%. Bazencići kod kojih je CPE zahvatao manje ili 50% sloja ćelija označavane se kao negativne. Titar virusa je izračunavan metodom po Reed and Muench (1938).

4.1.4.2 Virus neutralizacioni test (VNT)

Za izvođenje VNT su pored materijala opisanog u tački 4.1.2 korišćeni:

- Pozitivna kontrola – zbirni uzorak krvnog seruma nekoliko goveda vakcinisanih protiv BKK živom vakcinom, uzorkovan 28 dana nakon vakcinacije. Komplement u serumu je inaktivisan na temperaturi od 56°C u trajanju od 30 minuta. Pre uključivanja u VNT krvni serum je ispitan komercijalnim ELISA kitom za detekciju specifičnih antitela protiv virusa BKK (*ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species*, IDvet, Francuska) u kojem je reagovao pozitivno;
- Negativna kontrola – fetalni goveđi serum (Capricorn Scientific, Nemačka, lot: CP16-1377).

Princip virus neutralizacionog testa se zasniva na reakciji antitela, u opadajućem razređenju seruma i virusa konstantnog titra (100 TCID₅₀/50 μ l) (radno razređenje virusa) kao antigena. Virus neutralizacioni test je izveden u mikrotitar pločama za kulturu tkiva sa 96 bazenčića (Sarstedt, Nemačka). Pri izvođenju VNT na posebnoj mikrotitar ploči vršena je kontrola radnog razređenja virusa, kontrola ćelija i povratna “back” titracija virusa. U prvoj koloni mikrotitar ploče, u 8 bazenčića sipana je radna koncentracija virusa, druga kolona je služila za kontrolu ćelija, a narednih pet kolona korišćeno je za povratnu “back” titraciju izolovanog virusa sa razređenjima od 10^{-1} do 10^{-5} . Titracija radnog razređenja virusa je urađena je tako što je u sterilne tube od 10 ml (Greiner Bio-One GmbH, Austrija) prvo sipano po 4,5 ml podloge MEM

bez FBS. U prvu tubu je dodato 0,5 ml radnog razređenja virusa (100 TCID₅₀/50 µl), dobro promešano, čime je pripremljeno razređenje 10⁻¹, a zatim su pripremljena desetostruka serijska razređenja virusa do 10⁻⁵. Po 50 µl svakog razređenja je sipano u 8 uzastopnih bazenčića, posle čega je dodato 100 µl suspenzije ćelija (30000 ćelija/ml). Materijal je inkubiran 7 dana na 37°C, a zatim je vršeno očitavanje reakcije mikroskopski (Olympus, Japan).

Virus neutralizacioni test je izveden u mikrotitar pločama za kulturu tkiva sa 96 bazenčića (Sarstedt, Nemačka). Najpre su napravljena razređenja specifičnog pozitivnog i negativnog krvnog seruma tako što je u bazenčiće prvo sipano po 50 µl podloge MEM (Sigma, SAD), bez dodatka FBS, a zatim je dodato 50 µl pozitivnog, odnosno negativnog seruma, i višekanalnom pipetom su napravljena dvostruka serijska razređenja od 1:2 do 1:256. Svako razblaženje rađeno je u triplikatu. U svaki bazenčić sa pozitivnim i negativnim kontrolnim serumom dodato je po 50 µl radnog razređenja izolovanog virusa BKK (titra 100 TCID₅₀/50 µl). Mikrotitar ploče su zatim zatvorene, dobro promešane i inkubirane na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Nakon inkubacije u svaki bazenčić je dodato po 100 µl suspenzije ćelija MDBK (30000 ćelija/ml), a zatim su mikrotitar ploče ostavljene na 37°C uz svakodnevno posmatranje mikroskopski na prisustvo CPE. Očitavanje rezultata je vršeno posle 7 dana inkubacije. Titar antitela predstavljao je poslednje razređenje seruma u kojem nije utvrđena pojava CPE virusa.

4.2 SEKVENCIRANJE DELOVA GENOMA VIRUSA BKK I IZRADA FILOGENETSKOG STABLA

4.2.1 Sekvenciranje delova genoma virusa BKK

U cilju potvrde prisustva genoma virusa BKK u ispitivanim uzorcima, kao i analize stepena podudarnosti analognih nukleotidnih sekvenci izolovanog virusa BKK i virusa detektovanih u uzorcima sa ispitivanog područja sa analognim nukleotidnim sekvencama virusa BKK i drugih kapripoksvirusa (CaPV) koji se nalaze u međunarodnoj banci gena (*GenBank*, NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), izvršeno je sekvenciranje delova genoma virusa BKK.

Sekvenciranje delova genoma virusa BKK i to četiri gena: RPO30, GPCR, EEV i P32 urađeno je iz izolovanog virusa i šest uzoraka bioptata kože (pozitivnih real-time PCR) metodom po Sanger-u (Sanger i sar., 1977). Za izvođenje metode korišćeni su prajmeri specifični za gene RPO30, GPCR, EEV i P32, komercijalni kit namenjen za ekstrakciju i prečišćavanje dobijenih PCR proizvoda *mi-GEL Extraction Kit* (Metabion, Nemačka) i kit za sekvenciranje *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems, SAD). Metoda direktnog sekvenciranja po Sanger-u izvedena je na aparatu *Genetic Analyser 3130* (Applied Biosystems, SAD).

Nakon dobijanja pozitivnih rezultata primenom real-time PCR metode izvršene su četiri nezavisne PCR reakcije sa prajmerima specifičnim za gene RPO30, GPCR, EEV i P32. Reakcije su očitane na gel elektroforezi, a zatim su dobijeni produkti isečeni iz agaroznog gela. Iz isečenih delova gela vršena je ekstrakcija i prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda pomoću komercijalnog kita (*mi-GEL Extraction Kit*, Metabion, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Na ovaj način je PCR proizvod oslobođen od gela, neinkorporisanih nukleotida, etidijum bromida i drugih nespecifičnih proizvoda reakcije koji mogu negativno uticati na izvođenje metode sekvenciranja.

Za izvođenje reakcije sekvenciranja (*cycle sequencing PCR*) korišćen je komercijalni kit (*BigDye Terminator v3.1*, Applied Biosystems, SAD), a postupak je izveden po proceduri i uputstvu proizvođača kita. U Tabeli 1. dat je sastav reakcione smeše za sekvenciranje DNK proizvoda za jedan uzorak.

Tabela 1. Reakciona smeša za sekvenciranje DNK proizvoda za jedan uzorak

Dye Mix	4 µl
Dye bufer	2 µl
Voda za PCR	7 µl
Forward - F prajmer ili reverse - R prajmer* (3,2 pM)	1 µl
Uzorak prečišćenog PCR proizvoda	6 µl
Ukupno	20 µl

*Za svaki uzorak su pripremane dve PCR mešavine, u jednu je dodat "forward – F", a u drugu "reverse – R" prajmer.

Reakcija sekvenciranja je izvođena po temperaturnom režimu datom u Tabeli 2.

Tabela 2. Temperaturni režim za reakciju sekvenciranja DNK proizvoda

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1x	96 °C	1 minut
Denaturacija DNK		96°C	10 sekundi
Vezivanje prajmera	25x	50°C	5 sekundi
Elongacija lanca DNK		60°C	4 minuta

Po završetku, dobijeni PCR proizvodi su dodatno prečišćeni u svrhu dalje analize koristeći metodu precipitacije etanolom i EDTA (pH 8,0) na sledeći način:

- U tube sa PCR proizvodom (20 µl) dodato je po 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) i 60 µl 96% etanola (Sigma, SAD). Ovako pripremljeni uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 15 minuta.
- Posle završene inkubacije, uzorci su centrifugirani na 14000 g u trajanju od 15 minuta, nakon čega je supernatant odbačen.
- Uzorci su dodatno isprani dodavanjem 30 µl 70% etanola nakon čega su centrifugirani na 14000 g u trajanju od 15 minuta. Supernatant je odbačen, a tube su osušene na vazduhu na sobnoj temperaturi.

Nakon prečišćivanja, u uzorke je dodavano po 15 µl formamida (*Hi-Di™ Formamide*, Applied Biosystems, SAD), a zatim je urađena denaturacija po sledećem protokolu: 2 minuta na 95°C i 2 minuta na 4°C. Po završenoj denaturaciji, izvršena je analiza redosleda nukleotida ispitivanih gena koristeći aparat *Genetic Analyser 3130* (Applied Biosystems, SAD). Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequence Analysis 5.1 softver* (Applied Biosystems, SAD) kojim su dobijene nukleotidne sekvence u vidu elektroferograma analizirane u oba pravca, a zatim su primenom *Chromas Lite softvera* (*Technelysium, Australia*) upoređivane (*engl. alignment*) u 5' i 3' pravcu. Na taj način dobijena je kompletna (konsenzus) sekvenca, koja je dalje analizirana.

4.2.2 Izrada filogenetskog stabla

Po završenom sekvenciranju, dobijene nukleotidne sekvence RPO30, GPCR, EEV i P32 izolovanog i detektovanih virusa BKK upoređivane su sa analognim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016* i drugih kapripoksvirusa (CaPV) koji se nalaze u banci gena (*GenBank*) korišćenjem kompjuterskog softvera za upoređivanje sekvenci (*Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*), u cilju utvrđivanja stepena sličnosti ili razlika između njih. Položaj izolovanog i detektovanih virusa BKK na filogenetskom stablu, odnosno filogenetska analiza određena je upotrebom kompjuterskog programa MEGA 6 (*engl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura i sar., 2013) na osnovu automatski kreiranog stabla pomoću NJ (*eng. Neighbor-Joining*) metode.

U okviru doktorske disertacije formirano je filogenetsko stablo i izvršena filogenetska analiza kompletnog genoma virusa BKK soj *Serbia/Bujanovac/2016* (Manić i sar., 2019) čije je sekvenciranje urađeno od strane Toplak i sar. (2017).

U cilju filogenetske analize korišćeno je 20 nukleotidnih sekvenci izolata CaPV koji se nalaze u banci gena (*GenBank*), i to jedanaest nukleotidnih sekvenci virusa BKK (KY702007, MH893760, KX764645, KY829023, KX894508, KX764643, KX764644, MH646674, AF409137, AF325528, KX683219), četiri nukleotidne sekvence virusa boginja koza (GTPV) (KC951854, AY077835, AY077836, KX576657) i pet nukleotidnih sekvenci virusa boginja ovaca (SPPV) (AY077832, AY077833, AY077834, R KT438550, R KT438551).

4.3 ISPITIVANJE PRISUSTVA GENOMA VIRUSA BKK MOLEKULARNIM METODAMA

4.3.1 Uzorci za ispitivanje

U cilju dokazivanja prisustva genoma virusa BKK ukupno je ispitano 273 kliničkih uzorka (krv, nosni brisevi i bioptati kože) poreklom od 148 goveda, sa (n=82) i bez ispoljenih kliničkih simptoma (n=66), uzorkovanih u periodu pre sprovođenja vakcinacije protiv BKK, i 40 uzoraka poreklom od goveda (n=20) uzorkovanih posle sprovođenja vakcinacije atenuiranom vakcinom (*Neethling live attenuated vaccine, Onderstepoort*, Južna Afrika). Uzorci su prikupljeni u periodu od 06.06.2016. do 10.08.2016. godine tokom epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš. U cilju validacije novih protokola za izvođenje real-time PCR metode korišćeno je i 35 krvi goveda uzorkovanih tokom 2014. i 2015. godine (banka uzoraka VSI Niš), kao i uzorci krvi i nosnih briseva deset teladi sa farme mlečnih goveda „Lazar“, iz opštine Blace (Toplički okrug) vakcinisani tokom 2019. godine atenuiranom vakcinom protiv BKK pripremljenom od *Neethling* soja virusa. Uzorci krvi i nosnih briseva teladi uzorkovani su petog i desetog dana nakon vakcinacije (ukupno 40 uzoraka, 20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva). Uzorci su pre uključivanja u ispitivanje, a u cilju potvrde da su negativni na prisustvo virusa BKK, SPPV i GTPV ispitani real-time PCR metodom (Bowden i sar., 2008).

Za uzorkovanje krvi goveda korišćeni su sterilni špricevi, igle, vakutajner sistem, sterilne epruvete, a za dezinfekciju mesta uboda korišćen je 70% rastvor etil-alkohola. Uzorkovanje je vršeno u prisustvu Republičkog veterinarskog inspektora. Uzorci pune krvi životinja dobijeni su punkcijom vratne vene (*venae jugularis*). Korišćenjem principa asepse, krv je uzorkovana u sterilne plastične epruvete sa EDTA (BD Vacutainer Lot. 4160498, Belliver Industrial Estate, Engleska) u količini od oko 5,0 ml. Uzorci su skladišteni u tube od 2,0 ml (Eppendorf, Nemačka).

Bioptati kože uzorkovani su po svim principima asepse i dobrobiti životinja. Nakon uzorkovanja uzorci su stavljeni u sterilne posude sa sterilnim rastvorom fosfatnog pufera (PBS, pH 7) (OIE¹, 2018). Uzorci bioptata kože namenjeni za izolaciju virusa BKK su nakon uzorkovanja potapani u podlogu za rast i održavanje ćelijske linije (MEM) (Sigma, SAD) sa 10% fetalnog govedeg seruma (Capricorn Scientific, Nemačka).

Nosni brisevi su uzorkovani pomoću sterilnih briseva. Nakon uzorkovanja brisevi su stavljeni u 1,0 ml sterilnog rastvora fosfatnog pufera (PBS, pH 7,0) (OIE¹, 2018).

Svi uzorci su do ispitivanja čuvani na temperaturi od -70°C (Arctico, Danska).

4.3.2 Materijal za dokazivanje genoma virusa BKK

Za dokazivanje prisustva genoma virusa BKK u uzorcima primenom real-time PCR i nested PCR korišćeni su:

- komercijalni kit za ekstrakciju nukleinskih kiselina *QIAamp[®] cadof[®] Pathogen Mini Kit (250)* (Qiagen, Nemačka);
- specifični oligonukleotidni prajmeri i probe za real-time PCR protokole i nested PCR protokol (Metabion International AG, Nemačka);

- PCR mastermix za real-time PCR - *Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix* (Agilent, SAD), *Path-ID™ qPCR Master Mix*, (Applied Biosystems, SAD) i *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)* (Thermo Scientific, SAD);
- PCR mastermix - *Hot StarTaq PCR Mastermix 2x* (Qiagen, Nemačka);
- voda slobodna od nukleaza - voda za PCR (*nuclease-free water*) (Invitrogen, Litvanija);
- restrikcioni enzim (*Fast Digest MboI*) (Fermentas-Thermo Fisher Scientific Inc., SAD);
- materijal za elektroforezu (*DNA kit 1000 bp*) (Shimadzu, Japan);
- boja za PCR produkte (*SYBR Gold*) (Macrogen, Norveška);
- obojen DNK marker (*Fast gene 100bp DNA ladder H3RTU*) (NIPPON Genetics, Nemačka);
- komercijalni real-time PCR kit *LSDV Bio-T kit® Lumpy Skin Disease-DIVA* (Biosellal, Francuska).

Za izvođenje molekularnih metoda dijagnostike korišćena je sledeća oprema: biosigurnosni kabinet nivoa 2 (Faster, Italija), real-time PCR aparat (Applied biosystems 7500 Fast, SAD), real-time PCR aparat (AriaMx Real-Time PCR System Agilent, Nemačka), PCR aparat (PEQ Star, PEQLAB, Nemačka), kapilarna elektroforeza (MultiNA, Shimadzu, Japan), centrifuga sa rotorom za epruvete (MPW-352RH, Poljska), centrifuga sa rotorom za tube od 1,5 i 2,0 ml (Eppendorf, Nemačka), mini vortex-centrifuga (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Letonija), termošejker (Eppendorf, Nemačka).

4.3.3 Priprema uzoraka za ekstrakciju DNK

Ekstrakcija DNK virusa BKK rađena je iz uzoraka krvi, nosnih briseva i bioptata kože.

U cilju ekstrakcije DNK svaki bioptat kože je rasecan po sredini sa dva reza, a zatim je središnji deo koji obuhvata sve slojeve kože isečen skalpelom na sitne komadiće i stavljan u sterilnu epruvetu sa 3,0 ml sterilnog PBS rastvora i 5 g staklenih kuglica. Uzorci su vorteksirani tokom od 5 do 10 minuta (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Letonija), a zatim centrifugirani na 3000 g u trajanju od 15 sekundi (Eppendorf, Nemačka). Za ekstrakciju DNK korišćeno je 200 µl pripremljenog supernatanta.

Nosni brisevi su nakon odmrzavanja vorteksirani u trajanju od 1 minuta, a zatim je pamučni deo brisa odbačen. Za ekstrakciju DNK virusa korišćeno je 200 µl pripremljenog materijala.

Za ekstrakciju DNK iz uzoraka krvi nije vršena nikakva prethodna obrada uzorka, pri čemu je za ekstrakciju korišćeno 200 µl krvi.

4.3.3.1 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK virusa BKK iz uzoraka (puna krv, bioptati kože i nosni brisevi) vršena je pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju nukleinske kiseline prema uputstvu proizvođača kita (Qiagen, Nemačka) prema sledećem protokolu:

- Prva faza - liziranje uzoraka: U tube zapremine 2,0 ml (Eppendorf, Nemačka) dodavano je 20 µl proteinaze K, 200 µl homogenizovanog uzorka i 100 µl pufera za liziranje (VXL pufer). Zatim su tube vorteksirane 15 sekundi i inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi (20-25°C). Nakon inkubiranja tube sa sadržajem su kratko centrifugirane u trajanju od nekoliko sekundi (da bi se otklonili tragovi sadržaja sa zapušača i sprečila kontaminacija), a zatim je dodavano po 350 µl drugog pufera za liziranje (ACB pufer). Sadržaj je vorteksiran tokom 15 sekundi do potpune homogenizacije i kratko centrifugiran u trajanju od nekoliko sekundi.
- Druga faza - vezivanje virusne DNK za silika membranu: Pripremljeni sadržaj je pažljivo prebačen u kolone sa silika membranom i centrifugiran na 6000g tokom 1 minuta. Filtrat je

odbačen zajedno sa sabirnom tubom za sakupljanje filtrata i kolone sa silika membranom su postavljene u nove sabirne tube.

- Treća faza - ispiranje silika membrane prvim puferom za ispiranje (AW1 pufer): U kolonama sa silika membranom je dodato 600 µl pufera za ispiranje, posle čega su kolone centrifugirane na 6000 g tokom 1 minuta. Filtrat je odbačen zajedno sa sabirnom tubom za sakupljanje filtrata i kolone sa silika membranom su postavljene u nove sabirne tube.
- Četvrta faza - ispiranje silika membrane drugim puferom za ispiranje (AW2 pufer): U kolonama sa silika membranom je dodato 600 µl pufera za ispiranje posle čega su kolone centrifugirane na 6000 g tokom 1 minuta. Filtrat je odbačen zajedno sa sabirnom tubom za sakupljanje filtrata i kolone sa silika membranom su postavljene u nove sabirne tube.
- Peta faza - sušenje silika membrane: Kolone sa silika membranom su centrifugirane na 20000 g tokom 2 minuta.
- Šesta faza - otpuštanje virusne DNK: Kolone sa silika membranom su prebačene u tube od 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka), dodato je 100 µl rastvarača za otpuštanje DNK sa silika membrane (AVE pufer), a zatim su kolone inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 1 minuta i centrifugirane na 20000 g tokom 1 minuta.
- Ekstrahovana DNK je u mikrotubama (Eppendorf, Nemačka) čuvana na -20 °C do upotrebe.

4.3.4 Molekularne metode u detekciji virusa BKK

Uzorci ekstrahovane DNK iz uzoraka i izolata virusa BKK su ispitani primenom šest protokola za izvođenje metode real-time PCR i to: protokola koji su opisali Bowden i sar. (2008), KV-2 (Vidanović i sar., 2016), komercijalnog real-time PCR test (*LSDV Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease-DIVA*, Biosellal, Francuska), KV-vac protokola (razvijen i standardizovan u NRL za kapripoksviruse R. Srbije, VSI Kraljevo) i protokolima Terenski Niš i Vakcinalni Niš koji su razvijeni i standardizovani u Službi za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku VSI Niš. Uzorci su ispitani i protokolom za izvođenje nested PCR metode koji su opisali Menasherow i sar. (2014).

4.3.4.1 Protokol Bowden i sar. (2008) i KV-2

Materijal za ispitivanje obuhvatao je uzorke krvi sa EDTA (n=143), bioptate kože (n=82) i nosne briseve (n=8) od 148 životinja (82 sumnjivih* i 66 prijemčivih**) uzorkovanih pre početka vakcinacije i krv (n=6), bioptate kože (n=18) i nosne briseve (n=16) od 20 goveda*** kod kojih su se klinički simptomi ispoljili posle vakcinacije (*Neethling live attenuated vaccine*, Onderstepoort, Južna Afrika) (Tabela 3).

Tabela 3. Materijal za ispitivanje u real-time PCR metodi - protokol prema Bowden-u i KV-2

Uzorak	Broj uzoraka od sumnjivih goveda (n)*	Broj uzoraka od prijemčivih goveda**(n)	Broj uzoraka od sumnjivih goveda nakon vakcinacije***(n)	Ukupan broj uzoraka (n)
Puna krv	77	66	6	149
Bioptat kože	82	0	18	100
Nosni bris	8	0	16	24
Ukupno uzoraka	167	66	40	273

*sumnjive životinje - životinje sa kliničkim simptomima pre početka vakcinacije

**prijemčive životinje - životinje bez kliničkih simptoma pre početka vakcinacije

***sumnjive životinje nakon početka vakcinacije - životinje sa kliničkim simptomima nakon vakcinacije

U Tabeli 4. prikazan je broj životinja i vrsta uzoraka koji su uzorkovani pre i nakon početka vakcinacije. Kao što se u Tabeli 4. vidi od tri životinje pregledane su sve tri vrste uzoraka (puna krv, bioptat kože i nosni bris), od 74 životinje dve vrste uzoraka (krv i bioptat kože), a od pet bioptat kože i nosni bris. Od goveda bez ispoljenih kliničkih simptoma pre vakcinacije pregledani su samo uzorci krvi. Od goveda kod kojih su se simptomi pojavili nakon vakcinacije

ispitane su dve vrste uzoraka i to od 14 goveda bioptat kože i nosni bris, od četiri krv i bioptat kože, a od dva krv i nosni bris.

Tabela 4. Broj životinja i vrsta uzoraka za ispitivanje - protokol prema Bowden-u i KV-2

Uzorak	Broj životinja pre početka vakcinacije	Broj životinja nakon vakcinacije
Puna krv + bioptat kože + nosni bris	3	0
Puna krv + bioptat kože	74	4
Bioptat kože + nosni bris	5	14
Puna krv + nosni bris	0	2
Puna krv	66	0
Ukupno životinja	148	20

Real-time PCR reakcija za oba protokola je izvedena na aparatu Applied biosystems 7500 Fast (SAD) prema temperaturnom režimu prikazanom u Tabeli 5.

Tabela 5. Temperaturni režim za protokole prema Bowden i sar. (2008) i KV-2

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1x	95°C	3 minuta
Denaturacija DNK	45x	95°C	15 sekundi
Vezivanje prajmera		60°C	30 sekundi

Real-time PCR protokol prema Bowden-u izveden je prema opisanoj proceduri (Bowden i sar., 2008), uz korišćenje odgovarajućih prajmera i proba (Tabela 6). Kao pozitivna kontrola korišćena je DNK ekstrahovana iz referentnog soja *Serbia/Bujanovac/2016*.

Tabela 6. Redosled nukleotida za prajmere i probe za real-time PCR (Bowden i sar., 2008)

Protokol za real-time PCR	Prajmer/proba	Sekvence (5' - 3')
Bowden i sar., 2008	CaPV-074F1 (50µM)	AAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAA
	CaPV-074R1 (50µM)	AAATGAAACCAATGGATGGGATA
	CaPV-074P1, MGB TaqMan proba (50µM)	FAM-TGGCTCATAGATTCCT-MGBNFQ

Sastav reakcione smeše za jedan uzorak prikazan je u Tabeli 7.

Tabela 7. Reakciona smeša za real-time PCR protokol prema Bowden-u za jedan uzorak

Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix	12,5 µl
Voda za PCR	9 µl
CaPV-074F1 (50µM)	0,2 µl
CaPV-074R1 (50µM)	0,2 µl
CaPV-074P1, MGB TaqMan proba (50µM)	0,1 µl
Ukupno	22 µl

Nakon pripreme reakcionoj smeši je dodavano po 3 µl ekstrahovane DNK iz uzoraka. Finalna koncentracija prajmera u PCR reakciji iznosila je 400 nM, a koncentracija proba 200 nM. Proba je označena bojom FAM.

KV-2 protokol je izveden prema proceduri koju su opisali Vidanović i sar. (2016). Prajmeri i probe korišćeni u KV-2 protokolu prikazani su u Tabeli 8.

Tabela 8. Redosled nukleotida za prajmere i probe za real-time PCR - KV-2

Protokol za real-time PCR	Prajmer/proba	Sekvence (5' - 3')
KV-2 (Vidanović i sar., 2016)	LSD_KV_2_F (50µM)	TGGGATGATAACAACGTTTATG
	LSD_KV_2_R (50µM)	ACATTGTCATCCGGTAATGTA
	LSD_KV2_Pro_field (50µM)	VIC-TTACCACCTAATGATAGTGTTTATGAT TTACC-BHQ1

Sastav reakcione smeše za jedan uzorak u protokolu KV-2 prikazan je u Tabeli 9.

Tabela 9. Reakciona smeša za KV-2 protokol za jedan uzorak

Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix	12,5 µl
Voda za PCR	9 µl
LSD_KV_2_F (50µM)	0,2 µl
LSD_KV_2_R (50µM)	0,2 µl
LSD_KV2_Pro_field (50µM)	0,1 µl
Ukupno	22 µl

U KV-2 protokolu reakcionoj smeši dodavana je ekstrahovana DNK iz uzoraka u količini od 3 µl. Finalna koncentracija prajmera u PCR reakciji je iznosila je 400 nM, a finalna koncentracija proba 200 nM. U KV-2 protokolu proba je označena bojom VIC.

4.3.4.2 Nested PCR (RFLP PCR) - Menasherow i sar. (2014)

Protokolom za izvođenje nested PCR metode (Menasherow i sar., 2014) kojim se mogu razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK ukupno je ispitano 105 uzoraka i to: 49 uzoraka krvi, 50 uzoraka bioptata kože i 6 uzoraka nosnih briseva poreklom od 68 sumnjivih* goveda uzorkovanih pre početka vakcinacije i 40 uzoraka (6 uzoraka pune krvi, 18 bioptata kože i 16 uzoraka nosnih briseva) poreklom od 20 životinja*** kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije (Tabela 10).

Tabela 10. Materijal za ispitivanje u protokolu prema Menasherow-u

Uzorak	Broj uzoraka od sumnjivih goveda *(n)	Broj uzoraka od sumnjivih goveda nakon vakcinacije***(n)	Ukupan broj uzoraka (n)
Puna krv	49	6	55
Bioptat kože	50	18	68
Nosni bris	6	16	22
Ukupno uzoraka	105	40	145

*sumnjive životinje - životinje sa kliničkim simptomima pre početka vakcinacije

*** sumnjive životinje nakon početka vakcinacije - životinje sa kliničkim simptomima nakon početka vakcinacije

Protokol je izveden u dve reakcije (reakcija I i reakcija II) prema proceduri koju su opisali Menasherow i sar. (2014) na PCR aparatu PEQ Star (PEQLAB, Nemačka). Za izvođenje protokola korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 11. Kao pozitivna kontrola korišćena je DNK virusa BKK ekstrahovana iz referentnog soja *Serbia/Bujanovac/2016*.

Tabela 11. Redosled nukleotida za prajmere za nested PCR (Menasherow i sar., 2014)

Protokol za PCR	Prajmer	Sekvence (5' - 3')
Menasherow i sar., 2014	F LSDV 1044 (50µM)	AATCAATCACTTATTCAAC
	F LSDV 1092 (50µM)	AGTACTTGGTCAAATTGTAG
	R LSDV 1821 (50µM)	CCATCATTATTACCGAACCC
	R LSDV 1827 (50µM)	CCAATACCATCATTATTACC
	F LSDV 135 (50µM)	GGTGAAGAAAATTTAATTTGGGAT
	R LSDV 591 (50µM)	CCATTACCCACCTTTTTTTTGCC

U Tabeli 12. prikazan je sastav reakcione smeše za jedan uzorak u reakciji I.

Tabela 12. Sastav reakcione smeše za jedan uzorak - reakcija I (Menasherow i sar., 2014)

HotStarTaq PCR Mastermix 2x, Qiagen	12,5 µl
Voda za PCR	9,7 µl
F LSDV 1044 (50µM)	0,2 µl
F LSDV 1092 (50µM)	0,2 µl
R LSDV 1821 (50µM)	0,2 µl
R LSDV 1827 (50µM)	0,2 µl
Ukupno	23 µl

Pripremljenoj reakcionoj smeši je nakon ekstrakcije dodavano po 2 µl DNK. Finalna koncentracija prajmera u reakciji I iznosila je 400 nM. Reakcija I je izvedena prema temperaturnom režimu koji je prikazan u Tabeli 13.

Tabela 13. Temperaturni režim za protokol prema Menasherow-u (reakcija I)

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1 x	95 °C	15 minuta
Denaturacija DNK		95°C	30 sekundi
Vezivanje prajmera	35 x	44°C	40 sekundi
Elongacija		72°C	60 sekundi
Finalna elongacija	1 x	72°C	5 minuta
Čuvanje proizvoda reakcije do analize		4°C	∞

Na kraju reakcije I dobijen je PCR produkt dužine 748 bp koji je korišćen u reakciji II.

Sastav reakcione smeše za jedan uzorak u reakciji II prikazan je u Tabeli 14.

Tabela 14. Sastav reakcione smeše za jedan uzorak - reakcija II (Menasherow i sar., 2014)

HotStarTaq PCR Mastermix 2x, Qiagen	12,5 µl
Voda za PCR	10,1 µl
F LSDV 135 (50µM)	0,2 µl
R LSDV 591 (50µM)	0,2 µl
Ukupno	23 µl

Pripremljenoj reakcionoj smeši za reakciju II je dodavano po 2 µl PCR produkta iz reakcije I. Finalna koncentracija prajmera u reakciji II iznosila je 400 nM. Reakcija II je izvedena prema temperaturnom režimu koji je prikazan u Tabeli 15.

Tabela 15. Temperaturni režim za protokol prema Menasherow-u (reakcija II)

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1 x	95 °C	15 minuta
Denaturacija DNK		95°C	30 sekundi
Vezivanje prajmera	40 x	57°C	40 sekundi
Elongacija		72°C	60 sekundi
Finalna elongacija	1 x	72°C	5 minuta
Čuvanje proizvoda reakcije do analize		4°C	∞

Nakon završetka reakcije II dobijen je PCR produkt dužine 404 bp koji se koristio u reakciji enzimskog razlaganja restrikcionim enzimom izvedenoj prema uputstvu proizvođača (Fermentas - Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Za enzimsko razlaganje PCR produkta korišćena je mešavina sledećeg sastava: 16µl vode za PCR, 3µl *Fast Digest* pufera i 1µl restrikcionog enzima (*MboI*). Pripremljenoj mešavini dodavano je 10µl produkta reakcije II koji je prethodno razređen (3µl PCR produkta + 7µl vode za PCR). Mešavina je zatim inkubirana u termošejkeru (Eppendorf, Nemačka) na temperaturi od 37°C tokom 5 minuta, nakon čega su proizvodi enzimskog razlaganja očitavani na kapilarnoj elektroforezi (MultiNa, Shimadzu, Japan) pomoću DNK kita od 1000 bp prema uputstvu proizvođača (Shimadzu, Japan).

Pozitivnim nalazom na prisustvo terenskog soja virusa je smatrana pojava trake na gelu (PCR produkt) dužine 404 bp, dok je pozitivnim nalazom na prisustvo vakcinalnog soja (kao posledica

isecanja produkta PCR reakcije) smatrana pojava dve trake (PCR produkta) dužine 184 bp i 229 bp. Istovremeno prisustvo traka dužine 404 bp, 184 bp i 229 bp ukazivalo je na prisustvo i terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK.

4.3.4.3 Komercijalni real-time PCR test

Komercijalnim real-time PCR testom (*Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease - DIVA* Biosellal, Francuska) se detektuju dva target regiona: target LSDV (označen sa FAM) koji je zajednički za terenski i *Neethling* soj virusa BKK i target LSDV-DIVA (označen sa VIC) koji je specifičan samo za terenski soj virusa BKK. Ovim testom ispitano je 40 uzoraka (18 bioptata, 6 krvi i 16 nosnih briseva) od 20 goveda kod kojih su se klinički simptomi bolesti pojavili nakon vakcinacije.

U sastavu testa se nalazi:

- mastermiks;
- pozitivna kontrola (engl. *External Positive Control - EPC*) - sintetska DNK virusa BKK u koncentraciji 10^4 kopije;
- interna pozitivna kontrola (engl. *Internal Positive Control - IPC*) - za procenu integriteta uzorka, kvaliteta izolacije DNK i kvaliteta amplifikacije.

Izvođenje testa i interpretacija rezultata su urađeni prema uputstvu proizvođača testa. Rezultati su interpretirani na osnovu dobijenih Ct (*Cycle threshold*) vrednosti za target regione na način prikazan u Tabeli 16.

Tabela 16. Interpretacija rezultata *Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease - DIVA* komercijalnim real-time PCR testom

Target			Interpretacija
LSDV (FAM)	LSDV-DIVA (VIC)	IPC	
negativno	negativno	pozitivno	negativno na terenski i <i>Neethling</i> soj virusa
pozitivno Ct x*	pozitivno Ct x*	pozitivno	pozitivno na prisustvo terenskog soja virusa
pozitivno Ct y**	pozitivno Ct z>y**	pozitivno	pozitivno na prisustvo i terenskog i <i>Neethling</i> soja virusa
pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno na prisustvo <i>Neethling</i> soja virusa

* ukoliko je Ct vrednost dobijena za target LSDV (FAM) jednaka Ct vrednosti dobijenoj za LSDV-DIVA (VIC) prisutan je terenski soj virusa BKK.

** ukoliko je Ct vrednost dobijena za target LSDV-DIVA (VIC) veća od Ct vrednosti dobijene za target LSDV (FAM) prisutna su oba soja virusa BKK.

4.3.4.4 Protokol - KV-vac

Protokol KV-vac za izvođenje metode real-time PCR pripremljen je i validovan u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za kapripoksviruse, VSI Kraljevo. U protokolu za KV-vac prajmeri i proba su dizajnirani da detektuju deo LSDV008 gena vakcinalnih sojeva virusa, čime se omogućava visoka specifičnost protokola za detekciju samo vakcinalnih sojeva virusa BKK.

Protokolom KV-vac ispitano je 40 uzoraka od goveda kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije, kao i 40 uzoraka poreklom od deset vakcinisanih teladi (20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva). U Tabeli 17. dat je redosled nukleotida za prajmere i probe za KV-vac protokol.

Tabela 17. Redosled nukleotida za prajmere i probe za real-time PCR protokol KV-vac

Protokol za real-time PCR	Prajmer/proba	Sekvence (5' - 3')
KV-vac, NRL za kapripoksviruse (podaci nisu objavljeni)	LSDV_vacc_5670f (50µM)	TGCTTGTTTCCATTCTCCACT
	LSDV_vacc_5829r (50µM)	AAAAATGGGCGCAGTAGTATTT
	LSDV_vacc_5726_Pro (50µM)	FAM-CGCTGACATCGTTAGTCCACTCG-BHQ1

Sastav reakcione smeše za jedan uzorak prikazan je u Tabeli 18.

Tabela 18. Reakciona smeša za real-time PCR protokol KV-vac za jedan uzorak

Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix	12,5 µl
Voda za PCR	9 µl
LSDV_vacc_5670f (50µM)	0,2 µl
LSDV_vacc_5829r (50µM)	0,2 µl
LSDV_vacc_5726_Pro (50µM)	0,1 µl
Ukupno	22 µl

Pripremljenoj reakcionoj smeši je dodavano po 3 µl ekstrahovane DNK. Finalna koncentracija prajmera i proba u PCR reakciji je iznosila 400 nM, odnosno 200 nM. Proba je označena bojom FAM. Real-time PCR je izveden na aparatu Applied biosystems 7500 Fast (SAD) prema temperaturnom režimu prikazanom u Tabeli 19.

Tabela 19. Temperaturni režim za protokol KV-vac

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1x	95 °C	3 minuta
Denaturacija DNK	45x	95°C	15 sekundi
Vezivanje prajmera		60°C	30 sekundi

4.4 PRIPREMA I VALIDACIJA PROTOKOLA ZA IZVOĐENJE METODE REAL-TIME PCR ZA DETEKCIJU TERENSKOG I VAKCINALNOG SOJA VIRUSA BKK

U cilju dizajniranja prajmera i proba novih protokola za izvođenje real-time PCR metode, primenom softverskog programa MEGA 6, urađeno je poravnavanje sekvenci celih genoma virusa BKK, virusa boginja ovaca (*Sheeppox virus-SPPV*) i boginja koza (*Goatpox virus-GTPV*) deponovanih u Banci gena. Prajmeri i probe su dizajnirani korišćenjem kompjuterskog softvera - Primer Blast (Ye i sar., 2012) i Primer 3 (Untergasser i sar., 2012), a na osnovu utvrđenih razlika u redosledu nukleotida (*mismatch*) između terenskog soja virusa BKK (*Serbia/Bujanovac/2016*) i vakcinalnog soja virusa (*Neethling-LSD vaccine-OBP*).

4.4.1 Protokol za detekciju terenskih sojeva virusa BKK

Priprema real-time PCR protokola za detekciju terenskih sojeva virusa BKK urađena je tako što je primenom kompjuterskog softverskog programa utvrđeno da u okviru LSDV008 gena terenskog soja virusa (*Serbia/Bujanovac/2016*) postoje razlike u redosledu nukleotida u odnosu na vakcinalni soj. Utvrđena mesta korišćena su kao target region, odnosno prajmeri i proba za novi protokol za izvođenje metode real-time PCR Terenski Niš. Redosled nukleotida probe za detekciju terenskih sojeva virusa BKK (ACTATTGTCATCATTAATCCATCCA) je 100% identičan sa redosledom nukleotida genoma terenskih sojeva virusa BKK, na pozicijama od 5484 do 5508 LSDV008 gena. Na istim pozicijama LSDV008 gena kod vakcinalnih sojeva utvrđeno je da postoji razlika od 10 nukleotida (*mismatch*) u odnosu na probu. Na ovaj način u real-time PCR reakciji proba se 100% specifično vezuje samo za genom terenskih sojeva, a izostaje vezivanja probe za genom vakcinalnih sojeva virusa. Protokolom Terenski Niš dobija se ampikon dužine 150 bp.

Real-time PCR protokol Terenski Niš je izveden korišćenjem mastermiksa *Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix* (Agilent, SAD) u zapremini od 25 µl, na aparatu Applied biosystems 7500 Fast (SAD). Za nove real-time PCR protokole korišćeni su specifični oligonukleotidni prajmeri i probe proizvođača Metabion International AG (Nemačka) (Tabela 20).

Tabela 20. Redosled nukleotida za prajmere i probe za real-time PCR protokol Terenski Niš

Protokol za real-time PCR	Prajmer/proba	Sekvence (5' - 3')	Pozicija u genomu virusa	Dužina PCR produkta
Terenski Niš	Terenski Niš F (50µM)	CATGCTTGTTCATCTCC	5428-5447	150 bp
	Terenski Niš R (50µM)	GCTCTTTAAACTATGTTCTTCTTTCC	5551-5577	
	Terenski Niš proba (50µM)	Yakima Yellow - ACTATTGTCATCATTAATCCATCCA -BHQ1	5484-5508	

Sastav PCR reakcione smeše za Terenski Niš protokol za jedan uzorak prikazan je u Tabeli 21.

Tabela 21. Reakciona smeša za real-time PCR protokol Terenski Niš za jedan uzorak

Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix	12,5 µl
Voda za PCR	9 µl
Terenski Niš F (50µM)	0,2 µl
Terenski Niš R (50µM)	0,2 µl
Terenski Niš proba (50µM)	0,1 µl
Ukupno	22 µl

Reakcionoj smeši je dodavano po 3 µl ekstrahovane DNK. Finalna koncentracija prajmera u PCR reakciji je bila 400 nM, a finalna koncentracija proba 200 nM. U protokolu Terenski Niš proba je obeležena bojom Yakima Yellow.

Real-time PCR je izveden prema uslovima temperaturnog režima prikazanim u Tabeli 22.

Tabela 22. Temperaturni režim za real-time PCR protokole Terenski Niš i Vakcinalni Niš

	Broj ponavljanja	Temperatura	Vreme
Aktivacija polimeraze	1 x	95 °C	3 ili 10 minuta*
Denaturacija DNK	45 x	95°C	15 sekundi
Vezivanje prajmera		60°C	30 sekundi

* Aktivacija polimeraze kod *Brilliant III ultra fast qPCR master mix* traje 3 minuta, dok kod *Path-ID™ qPCR Master Mix* i *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)* denaturacija traje 10 minuta

4.4.2 Protokol za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK

Priprema real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK urađena je tako što je korišćenjem softverskih programa utvrđeno da u okviru LSDV146 gena vakcinalnog soja (*Neethling*) virusa BKK postoje razlike u redosledu nukleotida u odnosu na terenski soj. Utvrđena mesta korišćena su kao target region, odnosno prajmeri i proba za novi real-time PCR protokol Vakcinalni Niš. Redosled nukleotida probe za vakcinalne sojeve (TCGCGTCCTCTCCACCTTCA) je 100% identičan sa redosledom nukleotida na genomu vakcinalnih sojeva, na pozicijama od 139842 do 139861 u okviru gena LSDV146, pa se u real-time PCR reakciji proba 100% specifično vezuje za genom vakcinalnih sojeva. U genomu terenskih sojeva virusa BKK na tim pozicijama LSDV146 gena postoji razlika od 8 nukleotida (*mismatch*) u odnosu na probu. Protokolom Vakcinalni Niš dobija se ampikon dužine 152 bp.

U Tabeli 23. dat je redosled nukleotida za prajmere i probu za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš.

Tabela 23. Redosled nukleotida za prajmere i probe za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš

Protokol za real-time PCR	Prajmer/proba	Sekvence (5' - 3')	Pozicija u genomu virusa	Dužina PCR produkta
Vakcinalni Niš	Vakcinalni Niš F (50µM)	CACTAATGTACCTTGT TTTTGGACA	139747-139771	152 bp
	Vakcinalni Niš R (50µM)	ACGAATATAGATCATCGGTGCCA	139876-139898	
	Vakcinalni Niš proba (50µM)	FAM-TCGCGTCTCTCCACCTTCA-BHQ1	139842-139861	

Real-time PCR protokol Vakcinalni Niš je izveden korišćenjem komercijalnog mastermiksa *Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix* (Agilent, SAD) u zapremini od 25 µl. Sastav reakcione smeše za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš prikazan je u Tabeli 24.

Tabela 24. Reakciona smeša za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš za jedan uzorak

Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix	12,5 µl
Voda za PCR	9 µl
Vakcinalni Niš F (50µM)	0,2 µl
Vakcinalni Niš R (50µM)	0,2 µl
Vakcinalni Niš proba (50µM)	0,1 µl
Ukupno	22 µl

Reakciona smeša je optimizirana tako da je finalna koncentracija prajmera u PCR reakciji iznosila 400 nM, a finalna koncentracija proba 200 nM. Proba je označena bojom FAM. Nakon pripreme reakcione smeše dodavano je po 3 µl ekstrahovane DNK svakog uzorka. Real-time PCR je izveden prema temperaturnom režimu prikazanom u Tabeli 22.

4.4.3 Ispitivanje analitičkih i dijagnostičkih karakteristika real-time PCR protokola Terenski Niš i Vakcinalni Niš

U cilju provere analitičkih i dijagnostičkih karakteristika novih protokola za izvođenje real-time PCR metode ispitani su: efikasnost, analitička specifičnost i osetljivost, granična vrednost, ponovljivost, reproduktivnost i robustnost.

4.4.3.1 Ispitivanje efikasnosti

Efikasnost PCR reakcije za real-time PCR protokole Terenski Niš i Vakcinalni Niš određena je na osnovu standardna kriva i utvrđenog nagiba krive (*slope*). U cilju određivanja efikasnosti ispitana su desetostruka serijska razblaženja (10^0 - 10^6) genoma terenskog soja virusa *Serbia/Bujanovac/2016* (Terenski Niš) odnosno *Neethling* soja virusa (Vakcinalni Niš), pri čemu je svako razblaženje rađeno u duplikatu. Standardna kriva je formirana na osnovu dobijenih Ct vrednosti, tako što su na x osu nanošene logaritamske vrednosti dobijenih Ct vrednosti, a na y osu dobijene Ct vrednosti. Efikasnost real-time PCR reakcije je izračunata prema jednačini:

$$Efikasnost = \left(10^{\left(\frac{1}{nagib\ krive} \right)} - 1 \right) \times 100$$

Utvrđeni nagib standardne krive sa vrednostima između -3,1 i -3,6 ukazuje na efikasnost PCR reakcije od 90 do 110%. Standardna kriva koja ima vrednost nagiba -3,32 ukazuje na efikasnost PCR reakcije od 100% (TFS, Thermo Fisher Scientific, 2016).

4.4.3.2 Ispitivanje analitičke osetljivosti

Analitička osetljivost (granica osetljivosti) protokola Terenski Niš određena je ispitivanjem desetostrukih serijskih razblaženja (10^0 - 10^6) genoma terenskog soja virusa *BKK Serbia/Bujanovac/2016*, početne koncentracije 2000 TCID₅₀/µl. Analitička osetljivost protokola Vakcinalni Niš određena je ispitivanjem desetostrukih serijskih razblaženja (10^0 - 10^6) genoma

Neethling soja virusa početne koncentracije 200 TCID₅₀/μl. Svako razblaženje rađeno je u duplikatu. Najveće razblaženje tj. najmanja koncentracija genoma (terenskog odnosno vakcinalnog soja virusa BKK) sa kojima je dobijena pozitivna reakcija ispitano je u po 20 ponavljanja, rađenih u duplikatu. Najveće razblaženje sa kojim je dobijena pozitivna reakcija u 19 ponavljanja smatralo se donjom granicom osetljivosti na nivou pouzdanosti od 95% (BVL, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2016).

4.4.3.3 Ispitivanje analitičke specifičnosti

U cilju određivanja analitičke specifičnosti novih real-time PCR protokola ispitivano je 19 uzoraka pozitivnih na prisustvo genoma CaPV i to sedam uzoraka terenskih sojeva virusa boginja ovaca, četiri uzorka virusa boginja koza, dva uzorka terenskih i šest uzoraka vakcinalnih sojeva virusa BKK kao i dva negativna uzorka (kultura ćelija) (Tabela 25) (uzorci su dobijeni iz NRL za kapripoksviruse, VSI Kraljevo).

Tabela 25. Sojevi CaPV virusa korišćeni za ispitivanje specifičnosti real-time PCR protokola Terenski Niš i Vakcinalni Niš

<i>SPPV_Corum</i>
<i>SPPV_Kalmykia_Russia_2016</i>
<i>SPPV_Yaroslavl_Russia_2016</i>
<i>SPPV_Oman</i>
<i>GTPV_Dangarinskyi_Russia</i>
<i>GTPV_SA</i>
<i>GTPV_Oman</i>
<i>GTPV_Gorgan, Iraq</i>
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 1, vakcinalni <i>Neethling</i> soj virusa BKK
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 2, negativan uzorak (kultura ćelija)
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 3, vakcinalni <i>Neethling</i> soj virusa BKK
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 4, vakcinalni <i>Neethling</i> soj virusa BKK
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 5, terenski <i>Bulgaria/2016</i> soj virusa BKK
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 6, negativan uzorak (kultura ćelija)
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 7, SPPV <i>Ardel</i> soj
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 8, SPPV <i>Ardel</i> soj
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 9, vakcinalni <i>Neethling</i> soj virusa BKK
SCIENSANO (CODA CERVA), Belgija, 2017. godine 10, SPPV <i>Ardel</i> soj terenski soj <i>Serbia/Bujanovac/2016</i>
<i>Lumpy Skin Disease Vaccine for Cattle</i> (OBP), South-Africa, Batch No. 450
<i>SIS type vaccine</i> (Lumpyvax, MSD), South-Africa, Batch No. 17BLSN003

4.4.3.4 Određivanje granične vrednosti (*Cut-off*)

Granična vrednost (*Cut-off*) protokola (Terenski Niš i Vakcinalni Niš) za izvođenje real-time PCR metode određena je ispitivanjem prisustva genoma virusa BKK *Serbia/Bujanovac/2016* razblaženog do granice analitičke osetljivosti (0,4 TCID₅₀/ml) za Terenski Niš, odnosno *Neethling* soja (0,2 TCID₅₀/ml) za protokol Vakcinalni Niš. Ispitivanja su izvršena u po dvadeset ponavljanja. Nakon ispitivanja, dobijene srednje Ct (\bar{X}) vrednosti su uvećane za dve standardne devijacije (SD) i *Cut-off* vrednost je izračunata prema formuli:

$$\text{Granična vrednost (Cut-off)} = \bar{X} + 2 \times \text{SD}$$

gde je \bar{X} - srednja vrednost Ct, SD – standardna devijacija

4.4.3.5 Ispitivanje unakrsne reaktivnosti

U cilju utvrđivanja unakrsne reaktivnosti (*cross reactivity*) prajmera i proba korišćenih u pripremi novih real-time PCR protokola, ispitani su uzorci izolovane DNK/RNK referentnih sojeva 26 različitih mikroorganizama koji su prisutni kod goveda (vlasništvo VSI Niš) (Tabela 26).

Tabela 26. Mikroorganizmi korišćeni za ispitivanje unakrsne reaktivnosti

<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Rodococcus equi</i> (ATCC 6939)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC BAA-611)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Campylobacter coli</i> (ATCC 33559)
<i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124)	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i> (ATCC 33560)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica serovar. Enteritidis (grupa D)</i> (ATCC 13076)
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizeni</i> (ATCC 6633)	<i>Brucella abortus</i> 544 uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (VETQAS, 2018. godine)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	<i>Brucella melitensis</i> 16M uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (VETQAS, 2018. godine)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	<i>Brucella ovis</i> REO 198 uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (VETQAS, 2018. godine)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19112)	<i>Brucella abortus</i> S19 uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (VETQAS, 2018. godine)
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	BVDV soj 125 uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (NIV NS, 2018. godine)
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC 19119)	BHV-1 TN-41 uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (NIV NS, 2018. godine)
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 23715)	BTV uzorak iz međulaboratorijskog poređenja (NIVS Beograd, 2018. godine)

4.4.3.6 Ispitivanje ponovljivosti

Ponovljivost novih real-time PCR protokola određena je ispitivanjem genoma virusa *Serbia/Bujanovac/2016* (koncentracije 2 TCID₅₀/μl) protokolom Terenski Niš, odnosno genoma *Neethling* soja virusa (koncentracije 0,2 TCID₅₀/μl) protokolom Vakcinalni Niš u dvadeset ponavljanja tokom pet dana. Za svaki dan je izračunata srednja Ct vrednost, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV). Dobra ponovljivost je ukoliko je dobijena vrednost CV manja od 25% (FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee (RSSC), 2019).

4.4.3.7 Ispitivanje reproduktivnosti

Reproduktivnost protokola za izvođenje real-time PCR metode predstavlja visok stepen podudarnosti u rezultatima dobijenim ispitivanjem istog uzorka, istom metodom, od strane različitih analitičara u istoj laboratoriji (unutarlaboratorijska reproduktivnost). Reproductivnost real-time PCR protokola Terenski Niš i Vakcinalni Niš utvrđena je poređenjem Ct vrednosti dobijenih ispitivanjem prisustva genoma soja *Serbia/Bujanovac/2016*, odnosno *Neethling* soja virusa od strane dva analitičara kroz osam ponavljanja. Za svako ispitivanje je izračunata srednja Ct vrednost, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV).

4.4.3.8 Ispitivanje robustnosti

Robustnost protokola Terenski Niš za izvođenje metode real-time PCR proverena je tako što je uzorak pozitivan na prisustvo genoma terenskog soja virusa BKK (*Serbia/Bujanovac/2016*) ispitan uz određene modifikacije standardne procedure. Svaka modifikacija urađena je kroz tri ponavljanja pri čemu je svako ispitivanje rađeno u duplikatu. Modifikacije su podrazumevale korišćenje dva real-time PCR aparata (Applide Biosystems 7500 Fast i AriaMx Real-Time PCR System), pripremu reakcione smeše uz korišćenje tri različita mastermiksa (*Brilliant III Ultrafast qPCR kit* - Agilent, SAD, *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)*-Thermo Scientific, SAD i *Path-ID™qPCR Master Mix* - Applide Biosystems, SAD) i pripremu reakcione smeše korišćenjem prajmera i proba različitih koncentracija koje su se kretale u opsegu ±10% ispod ili iznad optimalne koncentracije (koncentracija prajmera od 360 nM do 440 nM, a koncentracija proba od 180 nM do 220 nM). Ispitivanje robustnosti protokola Vakcinalni Niš je sprovedeno na isti

način, a prilikom ispitivanja korišćen je uzorak genoma vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa. Nakon sprovedenih ispitivanja određene su srednje Ct vrednosti, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) za svaku modifikaciju. Ispitivanja robusnosti su sprovedena u Službi za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku VSI Niš i u NRL za kapripoksviruse R. Srbije (VSI Kraljevo).

4.4.3.9 Ispitivanje uzoraka novim protokolima za izvođenje real-time PCR metode Terenski Niš i Vakcinalni Niš

Protokolom Terenski Niš i Vakcinalni Niš ukupno je ispitano 220 uzoraka, i to 105 uzoraka koji potiču od sumnjivih životinja*, 40 uzoraka koji potiču od je životinja kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije***, 40 uzoraka (20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva) poreklom od deset teladi vakcinisanih atenuiranom vakcinom protiv BKK i 35 uzoraka krvi goveda uzorkovanih 2014/15 godine (Tabela 27).

Tabela 27. Materijal za ispitivanje real-time PCR protokolima Terenski Niš i Vakcinalni Niš

Uzorak	Broj uzoraka od sumnjivih životinja *	Broj uzoraka od sumnjivih životinja nakon početka vakcinacije***	Broj uzoraka poreklom od vakcinisanih teladi	Broj uzoraka goveda uzorkovanih 2014/15 godine	Ukupan broj uzoraka
Puna krv	49	6	20	35	110
Bioptat kože	50	18	0	0	68
Nosni bris	6	16	20	0	42
Ukupno uzoraka	105	40	40	35	220

*sumnjive životinje - životinje sa kliničkim simptomima pre početka vakcinacije

*** sumnjive životinje nakon početka vakcinacije - životinje sa kliničkim simptomima nakon početka vakcinacije

4.5 EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA EPIZOOTIJE BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ

4.5.1 Područje ispitivanja

Epizootiološka analiza epizootije bolesti kvrgave kože (BKK) obuhvatala je epizootiološko područje Veterinarskog specijalističkog instituta Niš (VSI Niš) koje se nalazi u jugoistočnom delu R. Srbije i obuhvata pet okruga: Pčinjski, Jablanički, Toplički, Pirotski i Nišavski okrug. Na ispitivanom području nadmorska visina se kreće od 200 do 1800 m (prosečno 1000 m). Pogranično područje prema Bugarskoj i Severnoj Makedoniji karakterišu brdsko-planinski predeli sa nadmorskom visinom od 662 m do 1922 m, nepovoljna konfiguracija terena, neizgrađenost putne mreže, tako da je povezanost sa unutrašnjošću R. Srbije i susednim zemljama izuzetno loša.

Na epizootiološkom područja VSI Niš tokom 2016. godine populaciju goveda činila su 92988 grla, sa prosečnom gustinom od 6,6 životinja/km² i to u Pčinjskom okrugu 22600 grla (6,3 životinja/km²), Jablaničkom okrugu 24141 grla (8,7 životinja/km²), Pirotskom okrugu 10318 grla (3,7 životinja/km²), Nišavskom okrugu 24099 (8,8 životinja/km²) i u Topličkom okrugu 12276 grla (5,5 životinja/km²) (podaci epizootiološke službe VSI Niš). Imajući u vidu proizvodne kategorije goveda, najzastupljenije su bile mlečne krave sa učešćem od 64,15%, telad 24,29%, priplodni bikovi 8,90%, i junice i bikovi za tov sa učešćem od 2,66% u ukupnoj populaciji prijemljivih životinja (podaci epizootiološke službe VSI Niš). Na ispitivanom području goveda se najčešće drže u okviru individualnih gazdinstva (mini farme) sa do 10 grla na gazdinstvu (EFSA, 2017). Srednje i velike farme goveda na ovom području su retke.

4.5.2 Prikupljanje epizootioloških podataka

U cilju epizootiološke analize epizootije BKK goveda na epizootiološkom području VSI Niš, koja je obuhvatala podatke o broju žarišta, broju prijemljivih životinja na gazdinstvima, broju obolelih i uginulih životinja, primenjene mere kontrole, suzbijanja i iskorenjivanja BKK i pojavu kliničkih simptoma posle vakcinacije (postvakcinalne komplikacije), korišćeni su podaci epizootiološke službe VSI Niš i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (Ministarstvo) R. Srbije. Podaci o geografskoj dužini i širini za svako žarište preuzeti su sa internet platforme *EMPRES Global Animal Disease Information System (EMPRES-i)* (<http://empres-i.fao.org/eipws3g/>). Podaci o klimatskim uslovima (temperatura i relativna vlažnost vazduha) za 2016. godinu preuzeti su iz Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ).

Tokom epizootije BKK na području R. Srbije mere kontrole i eradikacije BKK sprovedene su na osnovu odluke Ministarstva i Nacionalnog kriznog centra za kontrolu posebno opasnih zaraznih bolesti R. Srbije. U okviru doktorske disertacije opisane su i analizirane sprovedene mere i postignuti rezultati na epizootiološkom području VSI Niš.

Tokom trajanja epizootije BKK na području R. Srbije "slučaj bolesti" podrazumevao je pojavu opšteg infektivnog sindroma (povišena temperatura, gubitak apetita, pad mlečnosti i dr.) i/ili pojavu čvorova u koži (lokalnih i/ili generalizovanih), sa ili bez laboratorijske potvrde. „Žarište” je definisano kao pojava jednog ili više slučajeva bolesti u određenom stadu (gazdinstvu).

4.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni rezultati molekularnih ispitivanja su analizirani deskriptivnim statističkim metodama (aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV)) i relativni brojevi. Poređenje Ct vrednosti dobijenih različitim protokolima za izvođenje real-time PCR metode je ispitano primenom t-testa. Za određivanje osetljivosti i specifičnosti različitih protokola za izvođenje metode real-time PCR i nested PCR korišćen je online statistički program *MedCalc statistical software* (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) sa nivoom pouzdanosti od 95%. Međusobno slaganje rezultata dobijenih primenom različitih testova urađeno je *Kappa* statističkom analizom. Rezultati dobijeni primenom različitih protokola poređeni su pomoću χ^2 testa, a primenjivan je nivo pouzdanosti od 95%. Statistička obrada podataka je izvršena pomoću statističkog programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad, San Diego, CA, SAD) i *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD).

Prikupljeni epizootiološki podaci obrađeni su pomoću programa *Microsoft Office Excel 2010*, a zatim prebačeni u statistički paket *GraphPad Prism 6* (GraphPad, San Diego, CA, SAD). Za deskripciju podataka korišćeni su medijana i opseg (podaci koji ne podležu normalnoj raspodeli). Učestalosti su prikazivane kao apsolutne i relativne frekvencije izražene u procentima. Za poređenje dve grupe podataka korišćen je χ^2 test, a u svim poređenjima primenjivan je nivo značajnosti od 95%. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički preko kartograma i histograma.

Epizootiološka karta je napravljena pomoću kompjuterskog programa *QGIS 3.4 software* na osnovu podataka o geografskim koordinatama područja utvrđenih žarišta i tačnog datuma registrovanja svih žarišta BKK.

Pomoću on-line konvertera <https://www.advancedconverter.com/map-tools/find-altitude-by-coordinates>, na osnovu geografske širine/geografske dužine mesta na kome se žarište pojavilo, za svako žarište utvrđena je nadmorska visina. Prosečne vrednosti za nadmorsku visinu su preračunate u programu *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Udaljenost između žarišta je izračunata na osnovu geografske širine/geografske dužine svakog žarišta. Polazeći od pretpostavke da svako novo žarište može da nastane od prostorno najbližeg žarišta u periodu od 1 do 30 dana, izračunat je opseg širenja epizootije BKK u vremenu i prostoru na epizootiološkom području VSI Niš.

5. REZULTATI

5.1 REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA BKK, SEKVENCIRANJA GENOMA I MOLEKULARNIH ISPITIVANJA

5.1.1 Rezultati izolacije virusa BKK

Za izolaciju virusa BKK korišćeno je deset uzoraka bioptata kože goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima BKK u kojima je prethodno primenom real-time PCR (Bowden i sar., 2008 i KV-2) utvrđeno prisustvo nukleinske kiseline, korišćena je ćelijska linija MDBK. Virus BKK je izolovan iz jednog uzorka bioptata kože (1/10), a pojava CPE registrovana je posle druge pasaže. Prisustvo virusa BKK u kulturi ćelija je potvrđeno primenom klasičnih virusoloških metoda (VNT) i molekularnih metoda (real-time PCR protokol prema Bowden i sar., 2008 i KV-2 protokol). Izolovani virus dobio je naziv *Pčinj 1* i drugi je izolat virusa BKK sa područja R. Srbije.

5.1.2 Rezultati titracije izolovanog virusa (*Pčinj 1*) i VNT

Nakon sprovedene titracije (opisano u delu 4.1.4.1) utvrđeno je da je titar izolovanog virusa BKK (*Pčinj 1*) iznosio $6,0 \log_{10}$ TCID₅₀ u 1,0 ml. U virus neutralizacionom testu (VNT) sa specifičnim pozitivnim serumom, soj *Pčinj 1* je neutralisan specifičnim pozitivnim serumom protiv virusa BKK u titru 1:16, odnosno $4 \log_2$, dok u reakciji sa negativnim krvnim serumom nije bilo inhibicije rasta izolata virusa BKK, odnosno nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela (titar <2 , odnosno $<1 \log_2$). Titar virusa u povratnoj „back“ titraciji se kretao u rasponu od 30 do 300 TCID₅₀, a u kontroli ćelija nije utvrđen CPE što ukazuje da je VNT bio validan.

5.2 REZULTATI SEKVENCIRANJA DELA GENOMA VIRUSA BKK I FILOGENETSKA ANALIZA

Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u (Sanger i sar., 1977) određen je redosled nukleotida delova gena RPO30, GPCR, EEV i P32 izolovanog virusa (*Pčinj 1*) i virusa detektovanih u šest uzoraka bioptata kože u kojima je molekularnim metodama utvrđeno prisustvo genoma virusa BKK. Dobijene sekvence za sedam uzoraka su obrađene i analizirane korišćenjem softvera MEGA 6.0 i upoređene sa odgovarajućim analognim sekvencama za svaki uzorak, kao i sa analognim sekvencama deponovanim u banci gena (*GenBank*), korišćenjem osnovnog pretraživača za upoređivanje sekvenci (*Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) u cilju utvrđivanja stepena sličnosti ili razlike između njih.

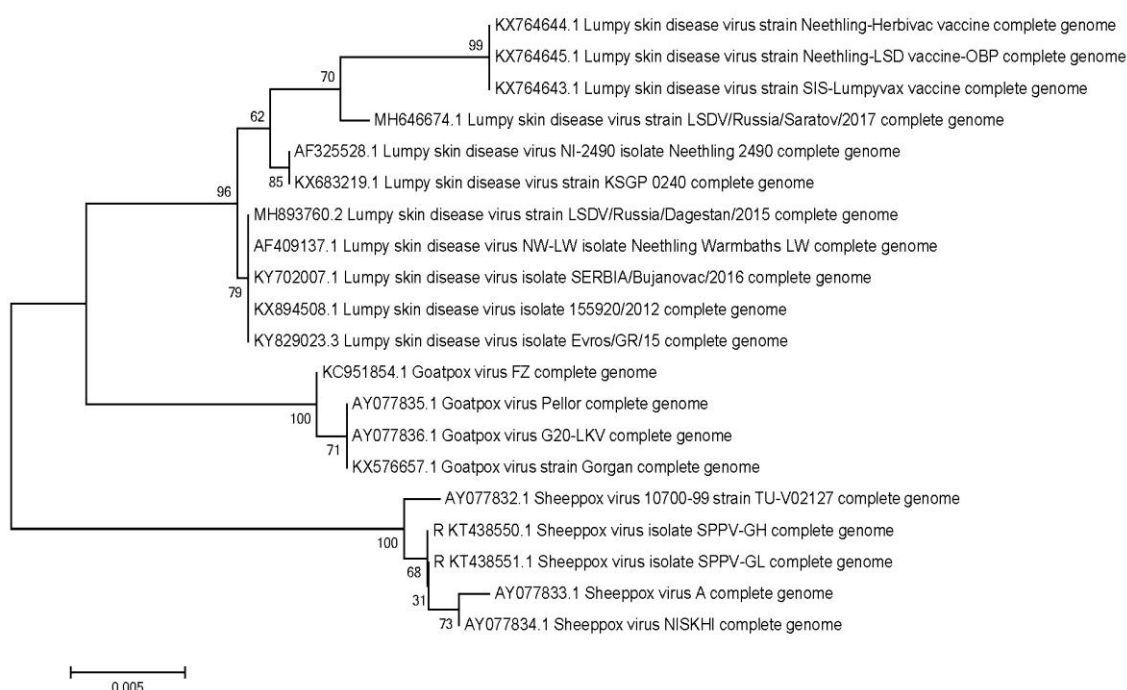
5.2.1 Filogenetska analiza na osnovu RPO30, GPCR, EEV i P32 gena

Sekvenciranjem sedam proizvoda PCR reakcije: izolovanog virusa BKK (*Pčinj 1*) i šest ekstrahovanih nukleinskih kiselina virusa BKK iz uzoraka bioptata kože (identifikovani virusi) uz korišćenje odgovarajućih prajmera za određeni deo gena (RPO30, GPCR, EEV, P32), dobijene su sekvence dužine 780 bp za deo RPO30 gena, 760 bp za deo GPCR, 664 bp za deo EEV gena i 681 bp za deo P32 gena.

Izradom filogenetskog stabla i filogenetskom analizom urađenom na osnovu RPO30, GPCR, EEV i P32 gena utvrđeno da su nukleotidne sekvence delova gena izolovanog soja *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK goveda sa epizootiološkog područja VSI Niš bile identične (100% sličnosti između analognih nukleotidnih sekvenci).

Rezultati ispitivanja su pokazali da su nukleotidne sekvence delova gena izolovanog soja *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK bile identične sa analognim nukleotidnim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016*. Imajući u vidu 100% podudarnost između analognih nukleotidnih sekvenci soja *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK sa sojem *Serbia/Bujanovac/2016* (svi sa epizootiološkog područja VSI Niš), u cilju izrade filogenetskog stabla i filogenetske analize korišćen je soj *Serbia/Bujanovac/2016*.

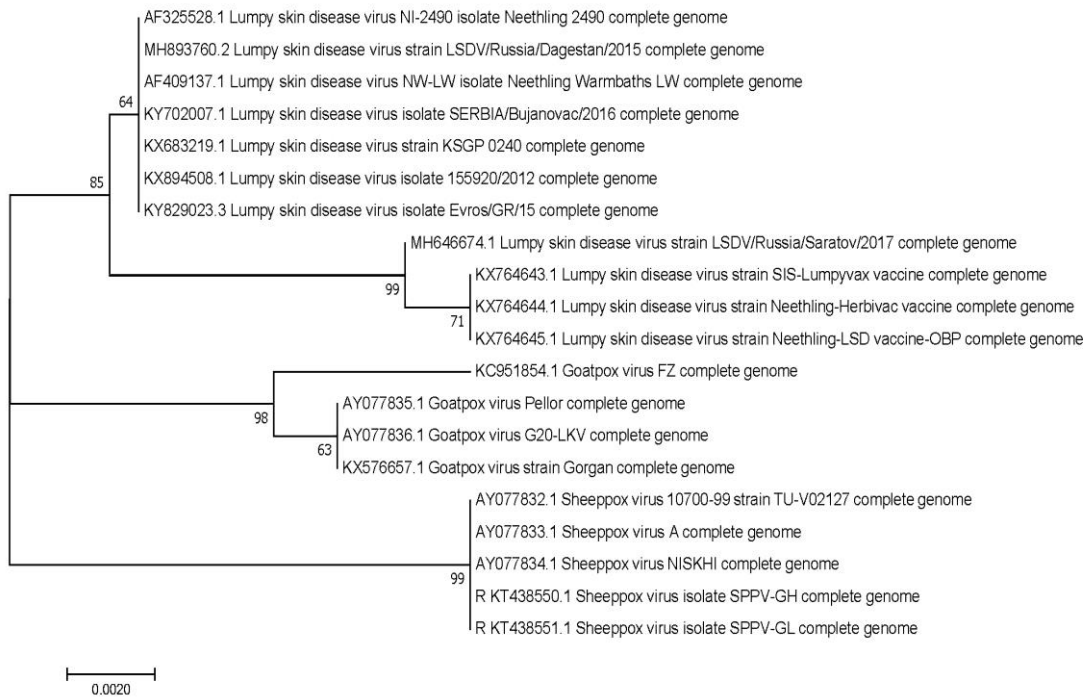
Filogenetska analiza je pokazala da oba soja virusa izolovana na području R. Srbije (*Serbia/Bujanovac/2016* i *Pčinj 1*), kao i virusi detektovani u bioptatima kože pripadaju podgrupi/podklasteru terenskih sojeva virusa BKK. Nukleotidne sekvence dela RPO30, GPCR, EEV i P32 gena imale su 100% sličnosti sa analognim sekvencama terenskih sojeva virusa BKK izolovanih na području Grčke (*Evros/GR/15*), Ruske Federacije (*Dagestan/2015*), Izraela (*155920/2012*) i Južne Afrike (*Neethling Warmbaths LW*) i niži stepen sličnosti sa vakcinalnim sojevima virusa BKK (*Neethling-LSD vaccine-OBP*, *SIS-Lumpyvax vaccine* i *Neethling-Herbivac vaccine*).



Slika 1. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci RPO30 gena virusa *Serbia/Bujanovac/2016* sa sekvencama CaPV preuzetim iz banke gena (*GenBank*)

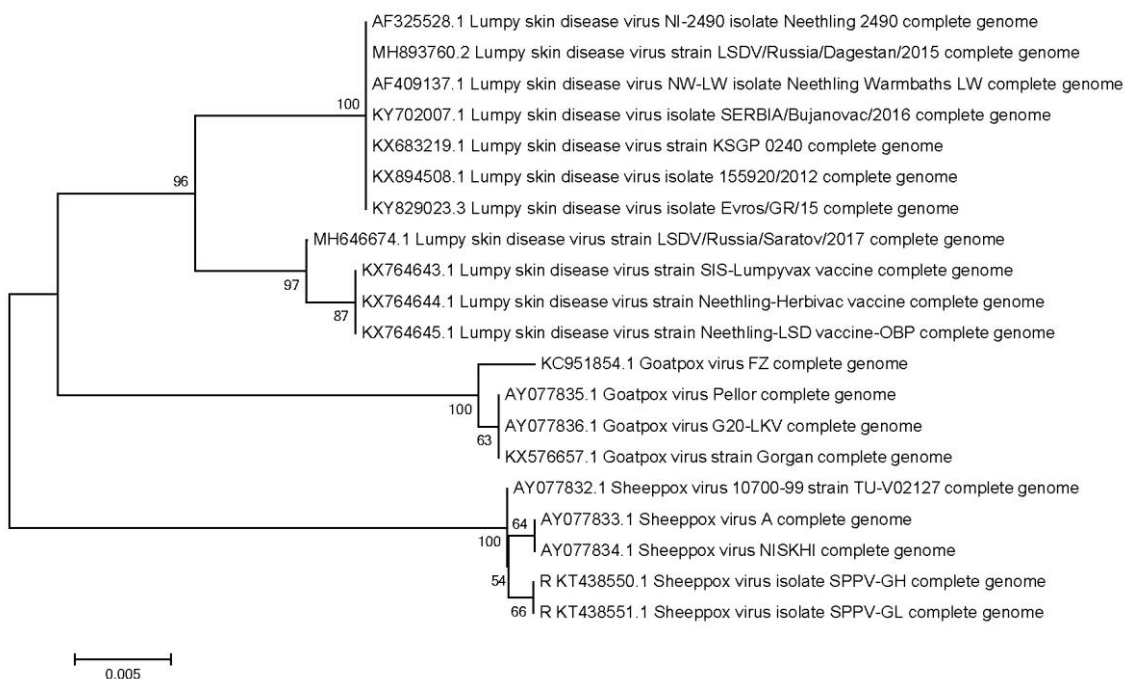
Filogenetskom analizom urađenom na osnovu RPO30 gena u posebnu podgrupu, blisku vakcinalnim sojevima virusa, izdvaja se soj virusa izolovan u Ruskoj Federaciji (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) za koji postoje izveštaji koji ukazuju da je u pitanju prvi rekombinantni virus BKK (Sprygin i sar., 2018b). Između soja *LSDV/Russia/Saratov/2017* i *Serbia/Bujanovac/2016* utvrđena je podudarnost u redosledu nukleotida od 99,99% (Slika 1).

Filogenetsko stablo i filogenetska analiza urađena na osnovu GPCR i P32 gena pokazala je da su nukleotidne sekvence delova gena GPCR i P32 izolovanog soja *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK bile identične sa analognim nukleotidnim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016*. Utvrđeno je da oba soja virusa izolovana na području R. Srbije (*Serbia/Bujanovac/2016* i *Pčinj 1*), kao i virusi detektovani u bioptatima kože pripadaju podgrupi/podklasteru terenskih sojeva virusa BKK. Nukleotidne sekvence dela GPCR i P32 gena izolovanog i identifikovanih virusa imale su 100% sličnosti sa analognim sekvencama terenskih sojeva virusa BKK izolovanih na području Grčke (*Evros/GR/15*), Ruske Federacije (*Dagestan/2015*), Izraela (*155920/2012*) i Južne Afrike (*Neethling Warmbaths LW*) i niži stepen sličnosti sa vakcinalnim sojevima virusa BKK (*Neethling-LSD vaccine-OBP*, *SIS-Lumpyvax vaccine* i *Neethling-Herbivac vaccine*).



Slika 2. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci GPCR gena virusa *Serbia/Bujanovac/2016* sa sekvencama CaPV preuzetim iz banke gena (*GenBank*)

Filogenetska analiza na osnovu GPCR i P32 gena je takođe pokazala da se soj *LSDV/Russia/Saratov/2017* izdvaja u posebnu podgrupu/podklaster i nalazi se između podgrupe terenskih u vakcinalnih sojeva virusa, pri čemu je utvrđena sličnost sa analognim sekvencama soja *LSDV/Russia/Saratov/2017* i *Serbia/Bujanovac/2016* od 99,99% (Slika 2 i Slika 3).

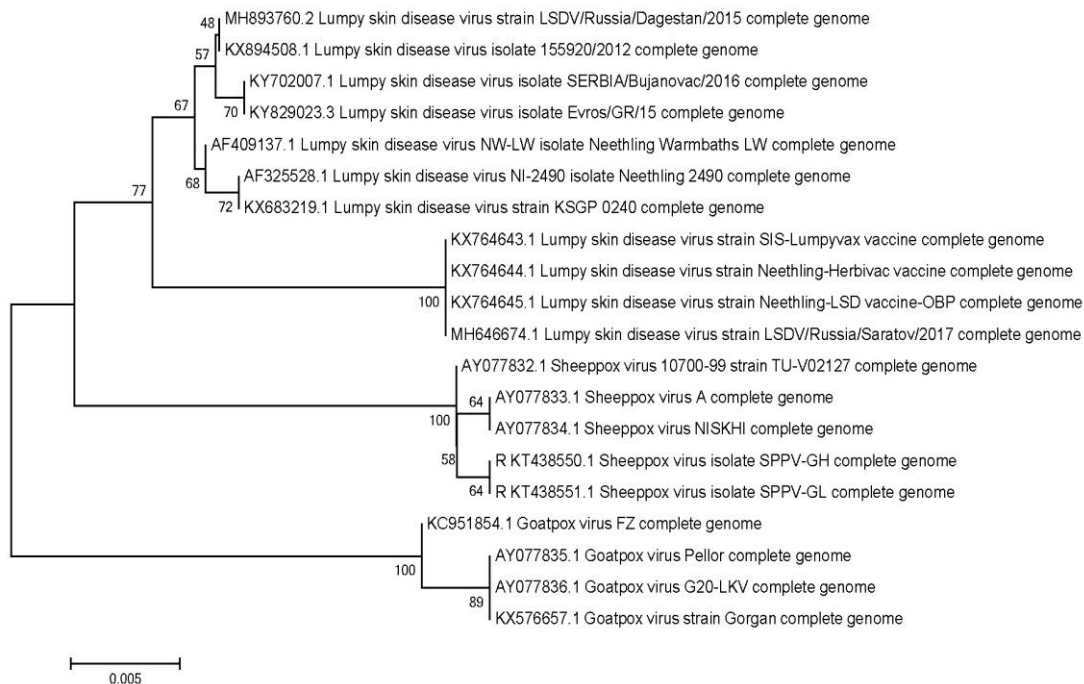


Slika 3. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci P32 gena virusa *Serbia/Bujanovac/2016* sa sekvencama CaPV preuzetim iz banke gena (*GenBank*)

Filogenetska analiza urađena na osnovu EEV gena pokazala je da soj *Serbia/Bujanovac/2016*, kao i soj *Pčinj 1* i virusi detektovani u uzorcima bioptata kože imaju 100% podudarnost u redosledu nukleotida sa terenskim sojevima virusa BKK izolovanim u Grčkoj (*Evros/GR/15*),

Ruskoj Federaciji (*Dagestan/2015*), Izraelu (*155920/2012*) i Južnoj Africi (*Neethling Warmbaths LW*) i niži stepen sličnosti sa vakcinalnim sojevima virusa BKK (*Neethling-LSD vaccine-OBP*, *SIS-Lumpyvax vaccine* i *Neethling-Herbivac vaccine*).

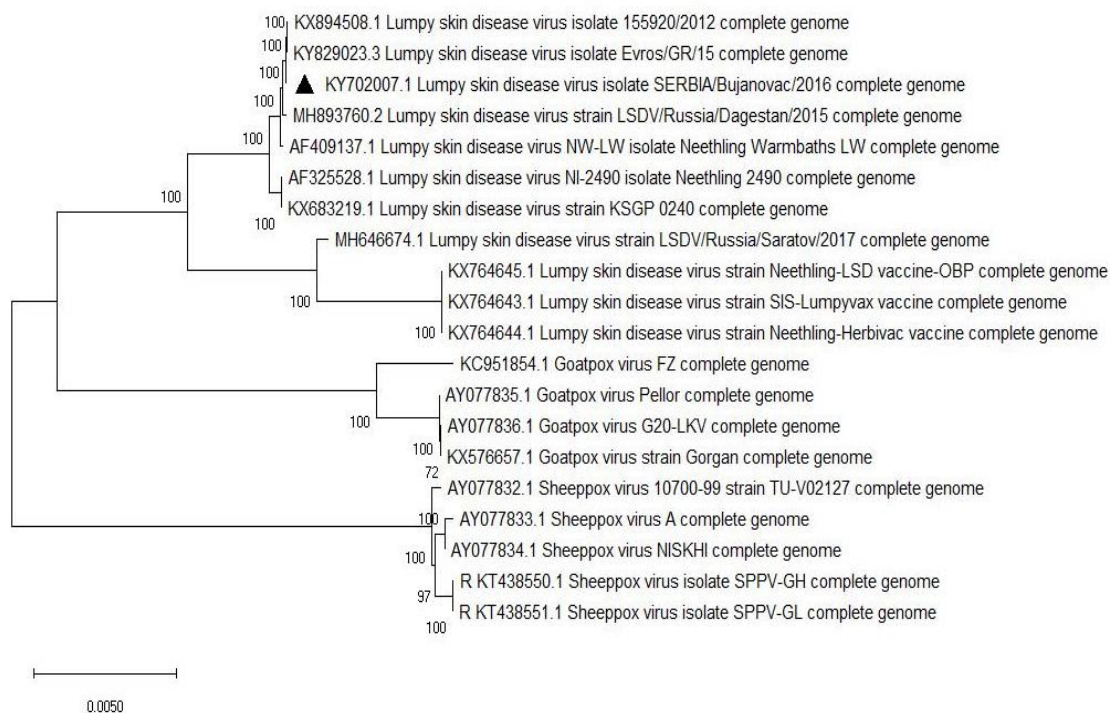
Filogenetska analiza urađena na osnovu EEV gena pokazala je da se soj izolovan u Ruskoj Federaciji *LSDV/Russia/Saratov/2017* nalazi u podgrupi/podklasteru sa vakcinalnim sojevima virusa BKK (*SIS-Lumpyvax vaccine*, *Neethling Herbivac vaccine* i *Neethling-LSD vaccine OBP*), pri čemu je podudarnost analognih sekvenci vakcinalnih sojeva i soja *Serbia/Bujanovac/2016* iznosila 99,98% (Slika 4).



Slika 4. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci EEV gena virusa *Serbia/Bujanovac/2016* sa sekvencama CaPV preuzetim iz banke gena (*GenBank*)

5.2.2 Filogenetska analiza celog genoma virusa BKK soj *Serbia/Bujanovac/2016*

Uvidom u filogenetsko stablo formirano na osnovu poređenja celog genoma soja *Serbia/Bujanovac/2016* sa celim genomima 19 CaPV koji se nalaze u banci gena (*GenBank*) utvrđeno je da se virus izolovan na područja R. Srbije (soj *Serbia/Bujanovac/2016*) nalazi u podgrupi/podklasteru sa terenskim sojevima virusa BKK. Filogenetskom analizom utvrđena je podudarnost u redosledu nukleotida sa sojem izolovanim u Grčkoj (*Evros/GR/15*) od 99,99%, Izraelu (*155920/2012*) 99,98%, Ruskoj Federaciji (*Dagestan/2015*) 99,96% i Južnoj Africi (*Neethling Warmbaths LW*) 99,95%. Manji stepen podudarnosti u redosledu nukleotida utvrđen je sa vakcinalnim sojevima virusa BKK i to *Neethling-LSD vaccine-OBP* (98,88%), *SIS-Lumpyvax vaccine* (98,87%) i *Neethling-Herbivac vaccine* (98,87%). Filogenetska analiza pokazala je da se soj izolovan u Ruskoj Federaciji (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) sa kojim soj *Serbia/Bujanovac/2016* ima podudarnost u redosledu nukleotida od 99,07%, izdvaja u posebnu podgrupu/podklaster virusa BKK koja se nalazi između podgrupe terenskih i vakcinalnih sojeva virusa (Slika 5). Na osnovu rezultata dobijenih filogenetskom analizom utvrđeno da soj virus BKK izolovan u R. Srbiji (*Serbia/Bujanovac/2016*) sličan terenskim sojevima virusa BKK koji su izolovani u različitim delovima sveta.



Slika 5. Filogenetsko stablo formirano na osnovu poređenja celog genoma virusa *Serbia/Bujanovac/2016* sa celim genomima CaPV preuzetim iz banke gena (*GenBank*) (Manić i sar., 2019)

5.3 REZULTATI ISPITIVANJA KLINIČKIH UZORAKA MOLEKULARNIM METODAMA

Na početku epizootije u R. Srbiji dijagnostika BKK se zasnivala na detekciji genoma virusa BKK korišćenjem real-time PCR metode protokol prema Bowden i sar. (2008) (Bowden) specifičan za sve CaPV (virus BKK, virus boginje ovaca i boginje koza) preporučen je protokol od strane OIE-a (OIE¹, 2018). Tokom epizootije na području R. Srbije u dijagnostiku BKK uveden je protokol KV-2 za izvođenje real-time PCR metode koji je specifičan za terenske sojeve virusa BKK (pripremljen i validovan u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za kapripoksviruse R. Srbije VSI Kraljevo) (Vidanović i sar., 2016). Uvođenjem vakcinacije protiv BKK, u cilju utvrđivanja prisustva terenskog ili vakcinalnog soja virusa, ili oba soja istovremeno kod goveda kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije korišćen je protokol za izvođenje nested PCR metode (Menasherow i sar., 2014).

5.3.1 Rezultati dobijeni primenom protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2

Real-time PCR protokolom prema Bowden-u od 167 uzoraka poreklom od goveda sa kliničkim simptomima ispoljenim pre vakcinacije (sumnjive*), genom virusa BKK utvrđen je u 79,6% (133/167) ispitanih uzoraka, i to 87,8% (72/82) bioptata kože, 62,5% (5/8) nosnih briseva i 72,7% (56/77) krvi.

Od 66 uzoraka krvi goveda koji su bili u kontaktu sa obolelim (prijemčive**) genom virusa BKK je detektovan u jednom uzorku 1,5% (1/66).

Sprovedenim ispitivanjem utvrđene su razlike u dobijenim Ct vrednostima u zavisnosti od vrste uzorka. Utvrđeno je da su bioptati kože imali najniže Ct vrednosti (Ct od 14,07 do 36,59, prosečno 19,86) u odnosu na uzorke nosnih briseva (Ct od 15,69 do 35,67, prosečno 27,51) i uzorke krvi (Ct od 20,80 do 36,38, prosečno 28,52) (Tabela 28). Dobijeni rezultati pokazuju da je najveća koncentracija virusa dokazana u uzorcima bioptata kože u odnosu na uzorke nosnih briseva i krv.

Tabela 28. Rezultati ispitivanja uzoraka protokolom prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 i prosečne Ct vrednosti utvrđene kod nevakcinisanih životinja

Uzorak	Grupa životinja	Broj ispitanih uzoraka (n)	Bowden i sar. (2008)		KV-2	
			Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost	Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost
Bioptat kože	*sumnjive	82	72 (87,8)	19,86	72 (87,8)	20,15
	**prijemčive	0	0		0	
Nosni bris	*sumnjive	8	5 (62,5)	27,51	5 (62,5)	27,96
	**prijemčive	0	0		0	
Krv	*sumnjive	77	56 (72,7)	28,52	54 (70,1)	30,18
	**prijemčive	66	1 (1,5)		1 (1,5)	
Ukupno	*sumnjive	167	133 (79,6)	25,30	131 (78,4)	26,10
	**prijemčive	66	1 (1,5)		1 (1,5)	
Ukupno	Sumnjive + prijemčive	233	134 (57,5)		132 (56,7)	

Primenom KV-2 protokola od 167 uzoraka koji potiču od sumnjivih životinja genom virusa BKK je detektovan u 78,4% (131/167) uzoraka, i to 87,8% (72/82) uzoraka bioptata kože, 62,5% (5/8) uzoraka nosnih briseva i 70,1% (54/77) uzoraka krvi.

Od 66 uzoraka krvi koji potiču od prijemčivih životinja genom virusa BKK je detektovan, kod jedne životinje 1,5% (1/66).

Primenom oba real-time PCR protokola genom virusa BKK je detektovan u 39 uzoraka poreklom od goveda sa kliničkim simptomima ispoljenim nakon vakcinacije (sumnjive nakon vakcinacije)*** i to u 100% ispitanih uzoraka bioptata kože (18/18) i krvi (6/6) i u 93,8% (15/16) uzoraka nosnih briseva. Kod jedne životinje kod koje je uzorak nosnog brisa bio negativan, genom virusa BKK detektovan u uzorku krvi.

Iz Tabele 28. se vidi da su i primenom KV-2 protokola najniže Ct vrednosti utvrđene u bioptatima kože (Ct od 14,16 do 38,42, prosečno 20,15), u odnosu na nosne briseve (Ct od 17,94 do 33,85, prosečno 27,96) i uzorke krvi (Ct od 22,14 do 38,61, prosečno 30,18).

5.3.2 Rezultati dobijeni protokolom - Menasherow i sar. (2014)

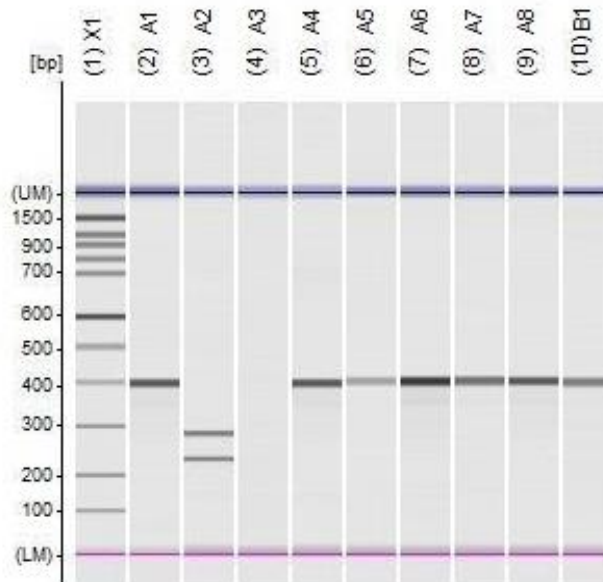
Nested PCR (Menasherow i sar., 2014) korišćen je u cilju utvrđivanja prisustva terenskog i/ili vakcinalnog soja virusa (ili oba soja istovremeno) u uzorcima poreklom od sumnjivih životinja (pre vakcinacije) i goveda kod kojih su se simptomi ispoljili posle vakcinacije. Ukupno je ispitano 105 uzoraka i to 50 bioptata kože, 6 nosnih briseva i 49 uzoraka krvi poreklom od 68 sumnjivih životinja.

Prisustvo genoma terenskog soja virusa utvrđeno je kod 60 goveda. Kao što se vidi iz Tabele 29. genom terenskog soja virusa BKK detektovan je u 86,7% ispitanih uzoraka sumnjivih goveda, sa najvećim procentom pozitivnih bioptata kože (96,0%), zatim uzoraka krvi (81,6%), dok je najmanje bilo pozitivnih uzoraka nosnih briseva (50,0%).

Tabela 29. Rezultati ispitivanja uzoraka sumnjivih goveda (pre početka vakcinacije) primenom real-time i nested PCR protokola

Uzorak	Broj ispitanih uzoraka (n)	Pozitivno – protokol Bowden n (%)	Pozitivno – protokol KV-2 n (%)	Pozitivno – protokol Menasherow n (%)	Pozitivno na terenski soj (protokol Menasherow) n (%)	Pozitivno na vakcinalni soj (protokol Menasherow) n (%)
Bioptat kože	50	50 (100)	50 (100)	48 (96,0)	48 (96,0)	0 (0)
Nosni bris	6	4 (75,0)	4 (75,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0)
Krv	49	46 (93,9)	44 (89,8)	40 (81,6)	40 (81,6)	0 (0)
Ukupno	105	100 (95,2)	98 (93,3)	91 (86,7)	91 (86,7)	0 (0)

Na slici 6. prikazan je deo rezultata dobijenih protokolom prema Menasherow-u za uzorke koji su poticali od sumnjivih životinja pre početka vakcinacije. Na slici elektroforezograma u liniji 2 uočava se prisustvo PCR produkta dužine 404 bp što ukazuje da je u uzorku prisutan terenski soj virusa (*Serbia/Bujanovac/2016*). U liniji 3 (vakcinalni soj *Neethling*) uočavaju dve trake - dva PCR produkta dužine 184 bp i 229 bp. Kod ispitivanih uzoraka (linije 5-10) uočava se samo jedna traka dužine 404 bp što potvrđuje da je u uzorcima prisutan terenski soj virusa BKK.



Slika 6. Rezultati nested PCR protokola prema Menasherow-u. Linija 1 - ladder, linija 2 - terenski soj virusa BKK (*Serbia/Bujanovac/2016*), linija 3 - vakcinalni soj virusa BKK, linija 4 - negativna kontrola, linija 5, 6, 7, 8, 9 i 10 - uzorci pozitivni na terenski soj virusa BKK (Manić i sar., 2019)

Ispitivanjem 40 uzoraka (18 uzoraka bioptata kože, 6 uzoraka krvi i 16 uzoraka nosnih briseva) od 20 životinja kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije genom virusa BKK je utvrđen kod svih 20 goveda. Iz Tabele 30. se vidi da je 92,5% (37/40) uzoraka bilo pozitivno, i to 100% (18/18) uzoraka bioptata kože, 87,5% (14/16) uzoraka nosnih briseva i 83,3% (5/6) uzoraka krvi.

Nakon primene restrikcionog enzima, u 97,3% (36/37) uzoraka je utvrđeno prisustvo genoma terenskog soja virusa, i to 100% (18/18) uzoraka bioptata kože, 92,9% (13/14) uzoraka nosnih briseva i 100% (5/5) uzoraka krvi. U četiri uzorka (10,8%) utvrđen je genom vakcinalnog soja virusa i to u dva uzorka nosnih briseva 14,3% (2/14) i dva uzorka krvi 40% (2/5).

U tri uzorka poreklom od 3 životinje, i to dva uzorka krvi (5% od svih ispitanih uzoraka) i jednom uzorku nosnog brisa (2,5% od svih ispitanih uzoraka) utvrđeno je istovremeno prisustvo vakcinalnog i terenskog soja virusa BKK. Prisustvo genoma samo vakcinalnog soja virusa dokazano je u jednom uzorku nosnog brisa (2,5% od svih ispitanih uzoraka). Rezultati dobijeni primenom nested PCR metode mogli bi ukazivati na postvakcinalne komplikacije kod jedne životinje (Tabela 30).

Tabela 30. Rezultati ispitivanja uzoraka sumnjivih goveda (nakon početka vakcinacije) primenom real-time i nested PCR protokola

Uzorak	Broj ispitanih uzoraka (n)	Broj pozitivnih uzoraka Bowden n (%)	Broj pozitivnih uzoraka KV-2 n (%)	Broj pozitivnih uzoraka Menasherow n (%)	Broj pozitivnih uzoraka na terenski soj (Menasherow) n (% u odnosu na broj pozitivnih)	Broj pozitivnih uzoraka na vakcinalni soj (Menasherow) n (% u odnosu na broj pozitivnih)
Bioptat kože	18	18 (100,0)	18 (100,0)	18 (100,0)	18 (100,0)	0 (0,0)
Nosni bris	16	15 (93,8)	15 (93,8)	14 (87,5)	13 (92,9)	2 (14,3)
Krv	6	6 (100,0)	6 (100,0)	5 (83,3)	5 (100,0)	2 (40,0)
Ukupno	40	39 (97,5)	39 (97,5)	37 (92,5)	36 (97,3)	4 (10,8)

Od 40 ispitanih uzoraka poreklom od vakcinisanih teladi koji su uzorkovani tokom 2019. godine kada u R. Srbiji epizootija BKK nije bila prisutna, primenom protokola prema Menasherow-u bila su pozitivna tri uzoraka (dva uzorka krvi i jedan uzorak nosnog brisa). Sva tri uzorka su bila pozitivna na prisustvo vakcinalnog soja virusa BKK. Isti uzorci su bili pozitivni i primenom protokola prema Bowden-u, dok su primenom KV-2 protokola svi ispitani uzorci (n=40) bili negativni.

5.3.3 Rezultati dobijeni komercijalnim real-time PCR testom

Komercijalnim real-time PCR testom (*Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease-DIVA, wild strains*) ispitano je 40 uzoraka poreklom od 20 goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima nakon vakcinacije. Genom virusa BKK detektovan je u 39 uzoraka. Prisustvo terenskog soja virusa dokazano je u 35 uzoraka (87,5%), a istovremeno prisustvo terenskog i vakcinalnog soja virusa u četiri uzorka (10,0%) (Tabela 31).

Tabela 31. Rezultati ispitivanja uzoraka komercijalnim real-time PCR testom

Uzorak	Ispitano (n)	Broj pozitivnih uzoraka - terenski soj virusa n (%)	Broj pozitivnih uzoraka - terenski i vakcinalni soj virusa (% u odnosu na broj ispitanih)	Broj pozitivnih uzoraka - vakcinalni soj virusa (% u odnosu na broj ispitanih)
Bioptat kože	18	18 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Nosni bris	16	13 (81,3)	2 (12,5)	0 (0,0)
Krv	6	4 (66,6)	2 (33,3)	0 (0,0)
Ukupno	40	35 (87,5)	4 (10,0)	0 (0,0)

5.3.4 Rezultati dobijeni protokolom KV-vac

Ispitivanjem 40 uzoraka od goveda nakon vakcinacije real-time PCR protokolom KV-vac vakcinalni soj virusa BKK detektovan je u četiri uzorka (10,0%) i to 2 nosna brisa i 2 uzorka krvi. Ispitivanjem 20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva 10 teladi uzorkovanih petog i desetog dana nakon vakcinacije vakcinalni soj je detektovan u samo 3 (7,5%) uzorka poreklom od dva teleta i to u jednom uzorku nosnog brisa i dva uzorka krvi. Utvrđeno je da su uzorci krvi imali niže Ct vrednosti (prosečno 25,46) u odnosu na uzorke nosnih briseva (prosečno 25,88) (Tabela 32).

Tabela 32. Rezultati ispitivanja uzoraka protokolom KV-vac i prosečne Ct vrednosti

Uzorak	Grupa životinja	Ispitano (n)	KV-vac	
			Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost
Biotat kože	nakon vakcinacije	18	0	-
	vakcinisana telad	0	0	
Nosni bris	nakon vakcinacije	16	2 (12,5)	25,88
	vakcinisana telad	20	1 (5,0)	
Krv	nakon vakcinacije	6	2 (33,3)	25,46
	vakcinisana telad	20	2 (10,0)	
Ukupno	nakon vakcinacije	40	4 (10,0)	25,64
	vakcinisana telad	40	3 (7,50)	
Ukupno		80	7 (8,75)	-

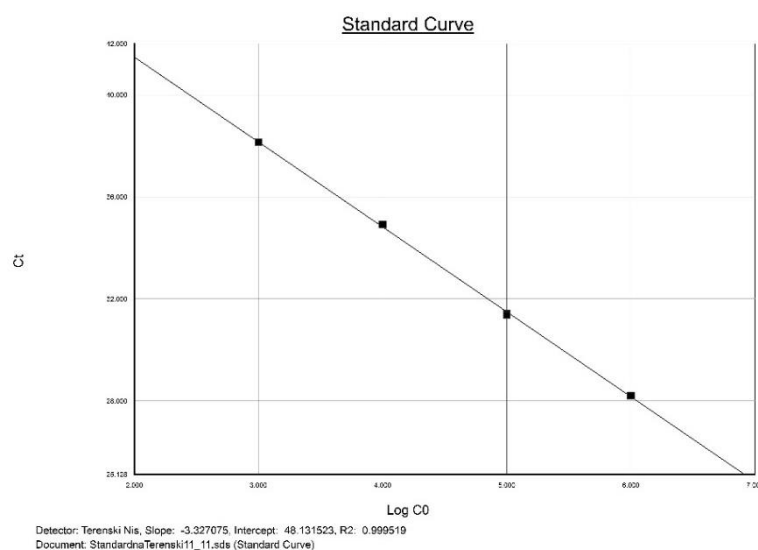
5.4 REZULTATI VALIDACIJE NOVIH REAL-TIME PCR PROTOKOLA ZA DETEKCIJU TERENSKOG I VAKCINALNOG SOJA VIRUSA BKK

5.4.1 Rezultati validacije real-time PCR protokola za detekciju terenskog soja virusa BKK (Terenski Niš)

Sekvenca prajmera i probe dizajniranih za real-time PCR protokol za detekciju terenskih sojeva virusa BKK Terenski Niš, zasnivala se na razlikama (*mismatches*) u redosledu nukleotida između terenskog (*Serbia/Bujanovac/2016*) i vakcinalnog soja virusa (*Neethling*) u delu LSDV008 gena. Zahvaljujući specifičnom vezivanju probe u delu LSDV008 gena terenskog soja virusa BKK omogućeno je da se real-time PCR protokolom Terenski Niš detektuje terenski soj virusa BKK.

5.4.1.1 Efikasnost protokola Terenski Niš

Efikasnost protokola Terenski Niš određena je na osnovu standardne krive i nagiba krive. Utvrđeni nagib krive iznosio je -3,33 što ukazuje na efikasnost od 99,66% (Slika 7). Vrednosti efikasnosti, RSq (dR) i nagiba krive su date u Tabeli 33.



Slika 7. Standardna kriva za real-time PCR protokol - Terenski Niš

*Vrednosti nagiba standardne krive između -3,1 i -3,6 daju efikasnost PCR reakcije između 90 i 110% (TFS, 2016)

Tabela 33. Efikasnost, RSq (dR) i nagib krive za Terenski Niš i Vakcinalni Niš protokol

Protokol	Target	Efikasnost	RSq (dR)	Nagib krive
Terenski Niš	Yakima Yellow	99,66%	0,999	-3,33
Vakcinalni Niš	FAM	98,84%	0,979	-3,35

5.4.1.2 Analitička osetljivost protokola Terenski Niš

Na osnovu sprovedenih ispitivanja (opisano u tački 4.4.3.2) utvrđena granica osetljivosti za protokol Terenski Niš bila je 0,4 TCID₅₀/ml (za nivo pouzdanosti od 95%).

5.4.1.3 Analitička specifičnost protokola Terenski Niš

Analitička specifičnost određena je tako što je pripremljenim protokolom ispitano sedam uzoraka pozitivnih na prisustvo genoma virusa boginja ovaca (*Corum*, *Kalmykia_Russia_2016*, *Yaroslavl_Russia_2016*, *Oman* i tri uzorka *Ardel* soja), četiri uzoraka pozitivnih na genom boginja koza (*Oman*, *Dangarinskyi_Russia*, *Gorgan*, *Iraq* i *SA*), dva uzorka pozitivna na prisustvo genoma terenskih (*Bulgaria/2016* i *Serbia/Bujanovac/2016*) i šest uzoraka pozitivnih na prisustvo genoma vakcinalnih (*Neethling*) sojeva virusa BKK (Tabela 25).

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da protokol Terenski Niš nije specifičan samo za terenske sojeve virusa BKK i da proba korišćena za ovaj protokol ima poklapanja u redosledu nukleotida sa delom genoma virusa boginja ovaca (SPPV) i boginja koza (GTPV). Sprovedenim ispitivanjem utvrđena je pozitivna reakcija sa svih sedam uzoraka pozitivnih na genom SPPV i tri uzorka pozitivna na GTPV.

Protokolom Terenski Niš dobijeni su negativni rezultati prilikom ispitivanja šest uzoraka koji sadrže vakcinalni (*Neethling*) soj virusa BKK čime je utvrđeno da se protokolom Terenski Niš može diferencirati prisustvo terenskih od vakcinalnih sojeva virusa BKK u ispitujućim uzorcima.

5.4.1.4 Granična vrednost (Cut-off) protokola Terenski Niš

Granična vrednost protokola Terenski Niš je izračunata na osnovu srednje Ct vrednosti dobijene ispitivanjem genoma virusa *Serbia/Bujanovac/2016* razblaženog do granice analitičke osetljivosti (0,4 TCID₅₀/ml) urađenim kroz dvadeset ponavljanja i uvećane za dve standardne devijacije (SD). Utvrđena srednja Ct vrednost (\bar{x}) iznosila je 38,14, a SD 0,8487. Na osnovu ovih podataka izračunata je granična vrednost:

$$\text{Granična vrednost (Cut-off)} = 38,14 + 2 \times 0,8487 = 39,8374 \approx 40$$

Utvrđena *Cut-off* vrednost za protokol Terenski Niš Ct je 40, što znači da se uzorak sa dobijenom Ct vrednosti koja je manja ili jednaka 40 ($Ct \leq 40$) smatra pozitivnim.

5.4.1.5 Unakrsna reaktivnost protokola Terenski Niš

Imajući u vidu da ispitivanjem ekstrahovane DNK/RNK 26 različitih mikroorganizama protokolom Terenski Niš nije dobijena pozitivna reakcija ni na jedan od ispitanih mikroorganizama isključena je unakrsne reaktivnosti (*cross reactivity*) prajmera i proba korišćenih u ovom protokolu.

5.4.1.6 Ponovljivost protokola Terenski Niš

Određivanje ponovljivosti protokola Terenski Niš izvršeno je tako što je isti uzorak (genom virusa *Serbia/Bujanovac/2016*) ispitivan u dvadeset ponavljanja koja su izvedena tokom pet dana (ukupno 100 ispitivanja). Za svako ispitivanje određene su srednje Ct vrednosti (\bar{x}), standardna devijacija (SD) i koeficijenti varijacije (CV) (Tabela 34).

Utvrđena srednja SD iznosila je 0,821, a CV 2,50. Dobijeni rezultati ukazuju da pripremljeni protokol ima dobru ponovljivost imajući u vidu vrednost CV, odnosno male varijacije u dobijenim Ct vrednostima pri ponavljenim ispitivanjima (t test 0,73; $p > 0,05$).

Tabela 34. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za real-time PCR protokol Terenski Niš

Ponavljjanje	1	2	3	4	5
	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)
1	31,858	33,172	32,135	32,971	33,143
2	33,002	32,370	34,267	32,172	33,502
3	33,235	32,277	33,214	32,371	33,409
4	33,268	31,288	32,584	32,217	33,451
5	33,145	33,217	33,512	33,168	33,305
6	32,123	33,168	33,385	31,190	32,293
7	33,053	32,190	34,283	33,007	33,199
8	32,048	33,482	33,229	34,167	33,150
9	32,560	32,327	34,129	31,543	31,431
10	33,065	33,555	32,543	33,533	32,719
11	31,852	32,675	32,430	33,065	34,275
12	33,006	31,438	32,227	32,542	32,130
13	32,501	32,732	33,289	33,467	33,562
14	33,321	31,132	33,180	33,625	33,430
15	34,409	33,370	33,529	33,413	32,607
16	31,836	34,117	34,270	31,313	33,241
17	33,100	33,542	32,657	32,532	34,272
18	32,659	32,269	32,426	32,762	32,168
19	33,761	32,652	33,765	31,487	33,955
20	31,145	31,347	34,563	32,624	33,783
\bar{X}	32,747	32,616	33,281	32,659	33,151
SD	0,768	0,853	0,761	0,827	0,737
CV	2,35	2,62	2,29	2,53	2,22

5.4.1.7 Reproductivnost protokola Terenski Niš

Unutarlaboratorijska reproductivnost protokola Terenski Niš utvrđena je tako što je isti uzorak ispitan od strane dva analitičara korišćenjem iste opreme. Nakon ispitivanja određene su prosečne Ct vrednosti (\bar{X}), standardna devijacija (SD) i koeficijenti varijacije (CV) za dobijene rezultate oba analitičara (Tabela 35). Analizom dobijenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnih Ct vrednosti koje su dobijene izvođenjem protokola Terenski Niš od strane dva analitičara (t test 0,38; $p > 0,05$). Dobijena vrednost CV ukazuje na dobru reproductivnost pripremljenog protokola.

Tabela 35. Rezultati ispitivanja reproductivnosti za real-time PCR protokol Terenski Niš

Reproductivnost	Analitičar A	Analitičar B
	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)
1	33,301	34,608
2	34,378	34,041
3	34,807	33,954
4	34,698	33,990
5	34,754	33,827
6	34,570	32,769
7	34,443	33,584
8	33,450	32,685
\bar{X}	34,300	33,682
SD	0,591	0,656
CV	1,72	1,95

5.4.1.8 Robustnost protokola Terenski Niš

Robustnost protokola Terenski Niš ispitana je tako što je protokol izveden sa određenim modifikacijama koje su podrazumevale upotrebu dva različita real-time PCR uređaja, pripremu reakcione smeše koristeći tri različita master miksa i izvođenjem PCR reakcije sa različitim koncentracijama prajmera i proba (Tabela 36).

Tabela 36. Rezultati ispitivanja robustnosti real-time PCR protokola Terenski Niš

	Procedura	Modifikovana procedura I	Modifikovana procedura II	Modifikovana procedura III	Modifikovana procedura IV	Modifikovana procedura V
PCR uređaj	Applied biosystems 7500 Fast	Applied biosystems 7500 Fast	Applied biosystems 7500 Fast	AriaMx Real-Time PCR System	AriaMx Real-Time PCR System	AriaMx Real-Time PCR System
Master miks	Agilent, SAD*	Applide Biosystems, SAD**	Thermo Scientific, SAD***	Agilent, SAD*	Applide Biosystems, SAD**	Thermo Scientific, SAD***
Konc. prajmera i proba	400nM i 200nM	360nM i 180nM	440nM i 220nM	400nM i 200nM	360nM i 180nM	440nM i 220nM
Ct	32,764	32,604	32,725	33,053	32,860	32,874
SD	0,399	0,834	0,823	0,915	0,837	0,617
CV	1,22	2,56	2,51	2,77	2,55	1,88

*Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix (Agilent, SAD); **Path-ID™ qPCR Master Mix (Applide Biosystems, SAD), ***Maxima Probe qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, SAD)

Analizom dobijenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnih Ct vrednosti koje su dobijene modifikacijama (t test 0,10; p>0,05).

5.4.2 Rezultati ispitivanja dobijeni primenom protokola Terenski Niš

Protokolom Terenski Niš ukupno je ispitano 145 uzoraka (68 bioptata kože, 22 nosnih briseva, 55 krvi) poreklom od 88 životinja, i to 105 uzoraka poreklom od 68 sumnjivih goveda i 40 uzoraka poreklom od 20 goveda kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije. Takođe, protokolom Terenski Niš ispitano je 40 uzoraka poreklom od deset vakcinisanih teladi (20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva uzorkovanih petog i desetog dana nakon vakcinacije) i 35 sigurno negativnih uzoraka na virus BKK (uzorci krvi goveda uzorkovani tokom 2014. i 2015. godine).

Primenom real-time PCR protokola Terenski Niš od 145 ispitanih uzoraka prisustvo genoma virusa BKK utvrđeno je u 95,2% (138/145) uzoraka, i to 100% (68/68) uzoraka bioptata kože, 92,7% (51/55) uzoraka krvi i 72,7% (16/22) uzoraka nosnih briseva. Od 105 uzoraka koji potiču od sumnjivih životinja, prisustvo genoma virusa BKK utvrđeno je u 94,3% (99/105) uzoraka, i to 100% (50/50) uzoraka bioptata kože, 66,7% (4/6) uzoraka nosnih briseva i 91,8% (45/49) uzoraka krvi. Od 40 uzoraka sumnjivih životinja nakon vakcinacije (n=40) primenom real-time PCR protokola Terenski Niš genom virusa BKK je detektovan u 39 (97,5%).

Utvrđeno je da su bioptati kože imali niže Ct vrednosti (Ct od 14,55 do 37,49, prosečno 21,52) u odnosu na uzorke nosnih briseva (Ct od 17,67 do 34,05, prosečno 26,91) i uzorke krvi (Ct od 23,43 do 38,99, prosečno 30,28) (Tabela 37).

Tabela 37. Rezultati real-time PCR protokola Terenski Niš i prosečne Ct vrednosti

Uzorak	Grupa životinja	Ispitano (n)	Terenski Niš	
			Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost
Bioptat kože	pre vakcinacije	50	50 (100,0)	21,52
	nakon vakcinacije	18	18 (100,0)	
Nosni bris	pre vakcinacije	6	4 (66,7)	26,91
	nakon vakcinacije	16	15 (93,8)	
Krv	pre vakcinacije	49	45 (91,8)	30,28
	nakon vakcinacije	6	6 (100,0)	
Ukupno	pre vakcinacije	105	99 (94,3)	25,96
	nakon vakcinacije	40	39 (97,5)	
Ukupno		145	138 (95,2)	-

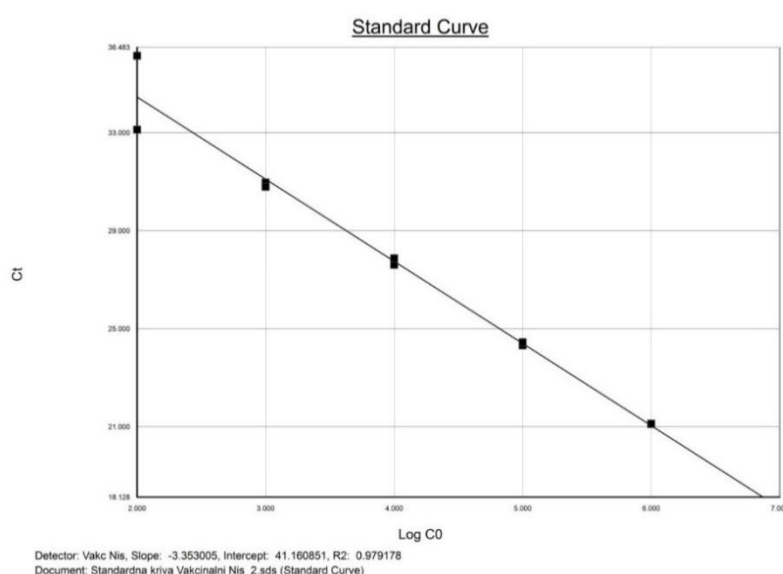
Ni u jednom uzorku poreklom od vakcinisane teladi, kao i u uzorcima krvi goveda uzorkovanih 2014. i 2015. godine protokolom Terenski Niš nije utvrđeno prisustvo terenskog soja virusa BKK.

5.4.3 Rezultati validacije real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK (Vakcinalni Niš)

Sekvenca prajmera i probe koji su dizajnirani za real-time PCR protokol za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK Vakcinalni Niš, zasniva se na razlikama (*mismatches*) u redosledu nukleotida između terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK u delu LSDV146 gena. Zahvaljujući specifičnom vezivanju probe u delu LSDV146 gena vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa BKK omogućeno je da se real-time PCR protokolom Vakcinalni Niš detektuju vakcinalni sojevi virusa BKK, dok se kod terenskog soja zbog razlike u redosledu nukleotida u LSDV146 genu ovim protokolom dobija negativan rezultat.

5.4.3.1 Efikasnost protokola Vakcinalni Niš

Efikasnost protokola Vakcinalni Niš određena je na osnovu standardne krive i nagiba krive. Nagib standardne krive iznosio je -3,35 što ukazuje na efikasnost od 98,84% (Slika 8). Vrednosti nagiba krive, RSq (dR) i efikasnosti za protokol Vakcinalni Niš date su u Tabeli 33.



Slika 8. Standardna kriva za real-time PCR protokol - Vakcinalni Niš

*Vrednosti nagiba standardne krive između -3,1 i -3,6 daju efikasnost PCR reakcije između 90 i 110% (TFS, 2016)

5.4.3.2 Analitička osetljivost protokola Vakcinalni Niš

Na osnovu sprovedenih ispitivanja (opisano u tački 4.4.3.2) utvrđena granica osetljivosti za protokol Vakcinalni Niš iznosi 0,2 TCID₅₀/ml (za nivo pouzdanosti od 95%).

5.4.3.3 Analitička specifičnost protokola Vakcinalni Niš

Analitička specifičnost protokola Vakcinalni Niš određena je tako što je ispitano sedam uzoraka pozitivnih na SPPV (*Corum*, *Kalmykia_Russia_2016*, *Yaroslavl_Russia_2016*, *Oman* i tri uzorka *Ardel* soja), četiri uzoraka na GTPV (*Oman*, *Dangarinskyi Russia*, *Gorgan*, *Iraq* i *SA*), kao i dva uzorka pozitivna na prisustvo genoma terenskih (*Bulgaria/2016* i *Serbia/Bujanovac/2016*) i šest uzoraka pozitivnih na prisustvo genoma vakcinalnih (*Neethling*) sojeva virusa BKK (Tabela 25).

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da je protokol Vakcinalni Niš specifičan samo za vakcinalne sojeve virusa BKK, imajući u vidu da ovim protokolom nije dobijen pozitivan rezultat ispitivanja uzoraka koji sadrže genom ostalih kapripoksvirusa (sedam sojeva SPPV i četiri soja GTPV) i terenskih sojeva virusa BKK. Na osnovu sprovedenih ispitivanja može se zaključiti da se ovim protokolom detektuju samo vakcinalni sojevi virusa BKK, odnosno mogu se razlikovati vakcinalni od terenskih sojeva virusa BKK, kao i vakcinalni sojevi virusa BKK od SPPV i GTPV.

5.4.3.4 Granična vrednost (Cut-off) protokola Vakcinalni Niš

Granična vrednost protokola Vakcinalni Niš je izračunata na osnovu srednje Ct vrednosti dobijene ispitivanjem vakcinalnog (*Neethling*) soja virusa razblaženog do granice analitičke osetljivosti (0,2 TCID₅₀/ml) kroz dvadeset ponavljanja i uvećane za dve standardne devijacije (SD). Utvrđena srednja Ct vrednost (\bar{X}) iznosila je 38,33, a standardna devijacija (SD) 0,7128. Na osnovu ovih podataka izračunata je granična vrednost:

$$\text{Granična vrednost (Cut-off)} = 38,33 + 2 \times 0,7128 = 39,7556 \approx 40$$

Utvrđena *Cut-off* vrednost za protokol Vakcinalni Niš Ct (Ct) je 40, što znači da se uzorak sa dobijenom Ct vrednosti koja je manja ili jednaka 40 ($Ct \leq 40$) smatra pozitivnim.

5.4.3.5 Unakrsna reaktivnost protokola Vakcinalni Niš

Ispitivanjem uzoraka ekstrahovane DNK/RNK referentnih sojeva različitih mikroorganizama utvrđeno je da protokolom Vakcinalni Niš nije dobijen pozitivan rezultat ni na jedan od navedenih mikroorganizama čime je isključena mogućnost unakrsne reaktivnosti (*cross reactivity*) prajmera i proba korišćenih u ovom protokolu.

5.4.3.6 Ponovljivost protokola Vakcinalni Niš

Određivanje ponovljivosti protokola Vakcinalni Niš izvršeno je tako što je uzorak genoma *Neethling* soja virusa testiran kroz dvadeset ponavljanja tokom pet dana (ukupno 100 ispitivanja). Za svako ispitivanje određene su srednje Ct vrednosti (\bar{X}), standardna devijacija (SD) i koeficijenti varijacije (CV) (Tabela 38). Utvrđena srednja SD iznosila je 0,796, a CV 2,17. Imajući u vidu male varijacije u dobijenim Ct vrednostima pri ponovljenim ispitivanjima (t test 0,76; $p > 0,05$) dobijeni rezultati ukazuju da pripremljeni protokol ima dobru ponovljivost.

Tabela 38. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš

Ponavljjanje	1	2	3	4	5
	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)	v (ΔR)
1	36,710	35,779	37,157	36,509	37,448
2	35,944	37,179	36,652	37,134	36,985
3	35,732	35,732	36,509	37,036	36,877
4	36,394	35,266	38,003	36,138	37,389
5	36,401	35,412	36,397	36,758	37,543
6	35,476	36,197	36,043	36,625	36,515
7	36,091	36,050	37,029	36,631	37,059
8	36,673	36,001	36,220	37,166	37,489
9	37,971	34,950	36,858	37,840	38,201
10	37,172	35,446	36,002	36,488	37,632
11	37,371	36,277	36,235	37,940	37,113
12	37,217	36,672	36,268	36,612	38,290
13	36,168	34,351	36,145	36,201	38,347
14	36,190	34,774	37,123	37,632	38,075
15	37,007	35,062	38,053	37,113	36,734
16	36,167	35,180	37,048	36,124	36,895
17	36,994	36,623	36,675	36,234	36,125
18	36,895	36,654	36,869	36,542	36,563
19	36,885	36,137	37,624	36,129	36,115
20	36,065	37,675	37,672	36,254	36,127
X	36,576	35,871	36,829	36,755	37,176
SD	0,620	0,842	0,635	0,567	0,711
CV	1,70	2,35	1,72	1,54	1,91

5.4.3.7 Reproductivnosti protokola Vakcinalni Niš

Unutarlaboratorijska reproductivnost protokola Vakcinalni Niš ispitana je tako što je isti uzorak ispitana od strane dva analitičara korišćenjem iste opreme. Nakon sprovedenog ispitivanja određene su srednjih Ct vrednosti (**X**), standardna devijacija (SD) i koeficijenti varijacije (CV) za rezultate koje su dobila oba analitičara (Tabela 39). Analizom dobijenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika između srednjih Ct vrednosti dobijenih izvođenjem protokola Vakcinalni Niš od strane dva analitičara (t test 0,74; $p > 0,05$). Utvrđena vrednost CV ukazuje na dobru reproductivnost protokola Vakcinalni Niš.

Tabela 39. Rezultati ispitivanja reproductivnosti za real-time PCR protokol Vakcinalni Niš

Reproductivnost	Analitičar A	Analitičar B
	Ct (ΔR)	Ct (ΔR)
1	37,301	38,608
2	38,378	38,041
3	38,807	37,954
4	38,698	37,990
5	38,754	37,827
6	38,570	36,769
7	38,443	37,584
8	37,450	36,685
SD	0,591	0,656
X	38,300	37,682
CV	1,54	1,74

5.4.3.8 Robustnost protokola Vakcinalni Niš

Robustnost protokola Vakcinalni Niš ispitana je tako što protokol izvođen uz primenu određenih modifikacija, a koje su podrazumevale korišćenje dva različita real-time PCR uređaja, pripremu reakcione smeše koristeći tri različita master miksa i izvođenjem PCR reakcije sa različitim koncentracijama prajmera i proba (Tabela 40).

Tabela 40. Rezultati ispitivanja robustnosti real-time PCR protokola Vakcinalni Niš

	Procedura	Modifikovana procedura I	Modifikovana procedura II	Modifikovana procedura III	Modifikovana procedura IV	Modifikovana procedura V
PCR uređaj	Applied biosystems 7500 Fast	Applied biosystems 7500 Fast	Applied biosystems 7500 Fast	AriaMx Real-Time PCR System	AriaMx Real-Time PCR System	AriaMx Real-Time PCR System
Master miks	Agilent, SAD*	Applide Biosystems, SAD**	Thermo Scientific, SAD***	Agilent, SAD*	Applide Biosystems, SAD**	Thermo Scientific, SAD***
Konc. prajmera i proba	400nM i 200nM	360nM i 180nM	440nM i 220nM	400nM i 200nM	360nM i 180nM	440nM i 220nM
Ct	36,128	35,441	35,646	36,638	36,726	36,751
SD	0,453	0,971	0,505	0,798	0,362	0,722
CV	1,254	2,740	1,417	2,178	0,986	1,964

*Brilliant III Ultra fast qPCR mastermix (Agilent, SAD); **Path-ID™ qPCR Master Mix (Applide Biosystems, SAD), ***Maxima Probe qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, SAD)

Analizom dobijenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnih Ct vrednosti koje su dobijene modifikacijama (t test 1,33; p>0,05).

5.4.4 Rezultati ispitivanja dobijeni protokolom Vakcinalni Niš

Real-time PCR protokolom Vakcinalni Niš ispitano je ukupno 145 uzoraka (68 bioptata kože, 22 nosnih briseva, 55 krvi) od 88 životinja, i to 105 uzoraka od 68 sumnjivih goveda, 40 uzoraka od 20 goveda kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije, 40 uzoraka poreklom od deset vakcinisanih teladi (20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva uzorkovanih petog i desetog dana nakon vakcinacije) i 35 krvi goveda uzorkovanih tokom 2014. i 2015. godine.

Rezultati ispitivanja navedenih uzoraka protokolom Vakcinalni Niš prikazani su u Tabeli 41. Sprovedenim ispitivanjem utvrđeno je da je ukupno bilo pozitivno 2,76% (4/145) uzoraka, i to 3,64% (2/55) uzoraka krvi i 9,09% (2/22) uzoraka nosnih briseva, dok bioptati kože nisu bili pozitivni na prisustvo vakcinalnog soja virusa. Uzorci krvi su imali niže Ct vrednosti (prosečno 25,87) u odnosu na uzorke nosnih briseva (prosečno 26,41). Svi pozitivni uzorci su poticali od životinja nakon vakcinacije 10,0% (4/40).

Tabela 41. Rezultati real-time PCR protokola Vakcinalni Niš i prosečne Ct vrednosti

Uzorak	Grupa životinja	Ispitano (n)	Vakcinalni Niš	
			Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost
Bioptat kože	pre vakcinacije	50	0	-
	nakon vakcinacije	18	0	
Nosni bris	pre vakcinacije	6	0	26,41
	nakon vakcinacije	16	2 (12,5)	
Krv	pre vakcinacije	49	0	25,87
	nakon vakcinacije	6	2 (33,3)	
Ukupno	pre vakcinacije	105	0	26,10
	nakon vakcinacije	40	4 (10,0)	
Ukupno		145	4 (2,76)	-

U uzorcima krvi goveda iz 2014. i 2015. godine kao ni u uzorcima poreklom od goveda pre vakcinacije nije utvrđeno prisustvo vakcinalnog soja virusa BKK.

Od 40 uzoraka poreklom od deset vakcinisanih teladi tri (7,5%) uzorka su bila pozitivna na prisustvo genoma vakcinalnog soja virusa. Petog dana nakon vakcinacije od 20 ispitanih uzoraka (10 uzoraka krvi i 10 uzoraka nosnih briseva) samo jedan uzorak krvi (5,0%) je bio pozitivan na prisustvo genoma vakcinalnog soja virusa BKK, dok su desetog dana nakon vakcinacije od 20 ispitanih uzoraka (10 uzoraka krvi i 10 uzoraka nosnih briseva) bila pozitivna dva uzorka, jedan uzorak krvi i jedan uzorak nosnog brisa (10,0%).

Poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem 40 uzoraka od deset vakcinisanih teladi (20 uzoraka krvi i 20 uzoraka nosnih briseva uzorkovanih petog i desetog dana nakon vakcinacije) protokolom prema Menasherow-u, KV-vac i Vakcinalni Niš protokolom dobijen je isti broj pozitivnih uzoraka primenom sva tri protokola.

5.4.5 Određivanje specifičnosti i osetljivosti novih real-time PCR protokola

Određivanje specifičnosti (Sp) i osetljivosti (Se) real-time PCR protokola urađena je prema modelu prikazanom u Tabeli 42.

Tabela 42. Model izračunavanja specifičnosti i osetljivosti real-time PCR protokola

Test	Stvarni status		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
Rezultati testa	Pozitivni	Stvarno pozitivni (SP)	SP + LP
	Negativni	Lažno negativni (LN)	SN + LN
Ukupno	SP + LN		Ukupno
Osetljivost Se	Se SP/(SP+LN)		
Specifičnost Sp	Sp SN/(SN+LP)		
Osetljivost	$Se = \frac{SP}{SP+LN} \times 100$		Specifičnost $Sp = \frac{SN}{SN+LP} \times 100$

5.4.5.1 Određivanje specifičnosti i osetljivosti protokola Terenski Niš

Dijagnostička osetljivost i specifičnost protokola Terenski Niš je izračunata na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem 145 uzoraka (105 uzoraka poreklom od sumnjivih životinja i 40 uzoraka poreklom od vakcinisanih životinja sa kliničkim simptomima posle vakcinacije). Kao standardni test korišćen je real-time protokol Bowden i sar. (2008), koji je preporučen real-time PCR protokol za detekciju virusa BKK od strane OIE (OIE¹, 2018).

U Tabeli 43. su prikazani rezultati dobijeni protokolom Terenski Niš u odnosu na protokol Bowden i sar. (2008).

Tabela 43. Prikaz specifičnosti i osetljivosti protokola Terenski Niš u odnosu na protokol prema Bowden-u

Protokol Terenski Niš	Stvarni status protokol prema Bowden i sar. (2008)		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
Rezultati	Pozitivni	Stvarno pozitivni (SP) 138	SP + LP 138
	Negativni	Lažno negativni (LN) 1	SN + LN 7
Ukupno	SP + LN 139		Ukupno 145
Osetljivost Se	Se SP/(SP+LN) 99,28		
Specifičnost Sp	Sp SN/(SN+LP) 100		

$$Se = \frac{138}{138+1} \times 100 = 99,28\% \quad Sp = \frac{6}{6+0} \times 100 = 100\%$$

Na osnovu izračunatih vrednosti utvrđena dijagnostička osetljivost protokola Terenski Niš iznosila je 99,28% (95% CI: 96,06% do 99,98%), a dijagnostička specifičnost 100% (95% CI: 54,07% do 100%).

Kao što se vidi iz Tabele 43. od 139 uzoraka pozitivnih protokolom prema Bowden-u, protokolom Terenski Niš registrovano je 138 pozitivnih uzoraka. Utvrđen je samo jedan lažno negativan uzorak i to uzorak krvi koji je imao visoku Ct vrednost, odnosno nisku koncentraciju virusa BKK. Osetljivost od 99,28% i specifičnost od 100% ukazuju na dobre karakteristike pripremljenog real-time protokola za detekciju terenskih sojeva virusa BKK.

Imajući u vidu da se KV-2 protokol koristio u dijagnostici BKK tokom epizootije BKK specifičnost i osetljivost protokola Terenski Niš je određena i u odnosu na KV-2 protokol. U Tabeli 44. dat je prikaz rezultata ispitivanja uzoraka primenom protokola Terenski Niš i KV-2 protokola.

Tabela 44. Rezultati ispitivanja protokola Terenski Niš u odnosu na KV-2 protokol

Protokol Terenski Niš	Stvarni status KV-2 protokol		Ukupno	
	Pozitivni	Negativni		
Rezultati	Pozitivni	Stvarno pozitivni (SP) 137	Lažno pozitivni (LP) 1	SP + LP 138
	Negativni	Lažno negativni (LN) 0	Stvarno negativni (SN) 7	SN + LN 7
Ukupno		SP + LN 137	SN + LN 8	Ukupno 145
Osetljivost Se		Se SP/(SP+LN)	Sp SN/(SN+LP)	
Specifičnost Sp		100	87,50	

$$Se = \frac{137}{137+0} \times 100 = 100\% \quad Sp = \frac{7}{7+1} \times 100 = 87,50\%$$

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđena dijagnostička osetljivost protokola Terenski Niš u odnosu na KV-2 protokol iznosila je 100% (95% CI: 97,34% do 100,00%), a dijagnostička specifičnost 87,50% (95% CI: 47,35% do 99,68%).

Kao što se vidi iz Tabele 44, KV-2 protokolom detektovano je 137 pozitivnih uzoraka, a protokolom Terenski Niš 138 pozitivnih uzoraka. Analizom dobijenih rezultata registrovan je jedan lažno pozitivan uzorak i to uzorak krvi za koji je utvrđena visoka Ct vrednost, odnosno niska koncentracija virusa BKK.

5.4.6 Određivanje specifičnosti i osetljivosti protokola za nested PCR (Menasherow i sar., 2014) u odnosu na protokole za izvođenje real-time PCR metode (Bowden i sar., 2008) i KV-2

S obzirom na dobijene rezultate koji ukazuju na manju osetljivost nested PCR protokola u odnosu na real-time PCR protokole izračunata je dijagnostička osetljivost i specifičnost protokola prema Menasherow i sar. (2014) u odnosu na protokol prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 protokol.

Dijagnostička osetljivost i specifičnost protokola prema Menasherow i sar. (2014) su izračunavane na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem 145 uzoraka (105 uzoraka poreklom od sumnjivih životinja i 40 uzoraka poreklom od vakcinisanih životinja sa kliničkim simptomima posle vakcinacije).

U Tabeli 45. su prikazani rezultati dobijeni protokolom prema Menasherow i sar. (2014) u odnosu na protokol prema Bowden i sar. (2008).

Tabela 45. Prikaz specifičnosti i osetljivosti protokola prema Menasherow i sar. (2014) u odnosu na protokol prema Bowden i sar. (2008)

Protokol prema Menasherow i sar. (2014)		Stvarni status protokola prema Bowden i sar. (2008)		Ukupno
		Pozitivni	Negativni	
Rezultati	Pozitivni	Stvarno pozitivni (SP) 127	Lažno pozitivni (LP) 0	SP + LP 127
	Negativni	Lažno negativni (LN) 12	Stvarno negativni (SN) 6	SN + LN 18
Ukupno		SP + LN 139	SN + LN 6	Ukupno 145
Osetljivost Se Specifičnost Sp		Se SP/ (SP+LN) 91,37	Sp SN/(SN+LP) 100	

$$Se = \frac{127}{127+12} \times 100 = 91,37\% \quad Sp = \frac{6}{6+0} \times 100 = 100\%$$

Na osnovu dobijenih rezultata, dijagnostička osetljivost protokola prema Menasherow-u u odnosu na protokol prema Bowden-u iznosila je 91,37% (95% CI: 85,41% do 95,46%), a dijagnostička specifičnost 100% (95% CI: 54,07% do 100%).

U Tabeli 46. su prikazani rezultati dobijeni protokolom prema Menasherow i sar. (2014) u odnosu na KV-2 protokol.

Tabela 46. Prikaz specifičnosti i osetljivosti protokola prema Menasherow i sar. (2014) u odnosu na KV-2 protokol

Protokol prema Menasherow i sar. (2014)		Stvarni status KV-2 protokol		Ukupno
		Pozitivni	Negativni	
Rezultati	Pozitivni	Stvarno pozitivni (SP) 127	Lažno pozitivni (LP) 0	SP + LP 127
	Negativni	Lažno negativni (LN) 10	Stvarno negativni (SN) 8	SN + LN 18
Ukupno		SP + LN 137	SN + LN 8	Ukupno 145
Osetljivost Se Specifičnost Sp		Se SP/ (SP+LN) 92,70	Sp SN/(SN+LP) 100	

$$Se = \frac{127}{127+10} \times 100 = 92,70\% \quad Sp = \frac{8}{8+0} \times 100 = 100\%$$

Kao što se vidi iz Tabele 46. od 137 uzoraka pozitivnih KV-2 protokolom, protokolom prema Menasherow i sar. (2014) registrovano je 127 pozitivnih uzoraka. Utvrđeno je 10 lažno negativnih uzoraka koji su imali visoku Ct vrednost, odnosno nisku koncentraciju virusa BKK. Na osnovu dobijenih rezultata, dijagnostička osetljivost protokola prema Menasherow-u u odnosu na KV-2 protokol iznosila je 92,70% (95% CI: 86,99% do 96,44%), a dijagnostička specifičnost 100% (95% CI: 59,04% do 100%).

5.4.7 Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR i nested PCR metode za detekciju terenskog soja virusa

U Tabeli 47. dat je uporedni prikaz rezultata dobijenih ispitivanjem 145 uzoraka primenom tri protokola za izvođenje real-time PCR metode i protokolom za izvođenje nested PCR metode.

Tabela 47. Uporedni prikaz rezultata real-time PCR protokola (Bowden, KV-2, Menasherow, Terenski Niš)

Uzorak	Grupa životinja	Ispitano n	Bowden		KV-2		Menasherow terenski soj		Terenski Niš	
			Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost	Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost	+	-	Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost
Bioptat kože	pre vakcinacije	50	50 (100)	20,91	50 (100)	20,10	48	2	50 (100)	
	nakon vakcinacije	18	18 (100)		18 (100)		18	0	18 (100)	
Nosni bris	pre vakcinacije	6	4 (66,7)	27,15	4 (66,7)	27,68	3	3	4 (66,7)	
	nakon vakcinacije	16	15 (93,8)		15 (93,8)		13	2	15 (93,8)	
Krv	pre vakcinacije	49	46 (93,9)	28,08	44 (89,8)	29,36	40	9	45 (91,8)	
	nakon vakcinacije	6	6 (100)		6 (100)		5	1	6 (100)	
Ukupno	pre vakcinacije	105	100 (95,2)	-	98 (93,3)	-	91	14	99 (94,3)	
	nakon vakcinacije	40	39 (97,5)	-	39 (97,5)	-	36	4	39 (97,5)	
Ukupno		145	139 (95,9)		24,67	24,76	127	18	138 (95,2)	

Primenom χ^2 testa nije ustanovljena statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR metode: protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2 protokola (χ^2 test 0,07; $p>0,05$), protokola Bowden i sar. (2008) i protokola Terenski Niš (χ^2 test 0,08; $p>0,05$), protokola KV-2 i Terenski Niš (χ^2 test 0,07; $p>0,05$). Međutim, statistički značajna razlika ustanovljena je u broju pozitivnih uzoraka dobijenih primenom protokola Bowden i sar. (2008) i Menasherow i sar. (2014) (χ^2 test 6,54; $p<0,05$), KV-2 i protokola Menasherow i sar. (2014) (χ^2 test 4,22; $p<0,05$) i protokola Terenski Niš i Menasherow i sar. (2014) (χ^2 test 5,30; $p<0,05$).

U Tabeli 48. dat je uporedni prikaz srednjih Ct vrednosti dobijenih protokolima prema Bowden-u, KV-2 i Terenski Niš za ispitane uzorke (n=145).

Tabela 48. Uporedni prikaz srednjih Ct vrednosti PCR protokola

PCR protokol	Srednja Ct vrednost	min Ct	max Ct
Bowden	24,67	14,07	36,59
KV-2	24,76	14,16	38,61
Terenski Niš	25,96	14,55	38,99

Primenom t-testa, nije utvrđena statistički značajna razlika između srednjih Ct vrednosti dobijenih ispitivanjem istih uzoraka primenom ova tri protokola za izvođenje metode real-time PCR (t-test, $p>0,05$).

5.4.8 *Kappa* (κ) statistička analiza rezultata dobijenih primenom različitih protokola za detekciju terenskog soja virusa BKK

U cilju ispitivanja usaglašenosti rezultata dobijenih primenom različitih molekularnih testova određena je *Kappa* (k) saglasnost. *Kappa* vrednost se može kretati od 1 za potpunu podudarnost do 0 za podudarnost koja je jednaka onoj koja bi se očekivala pri slučajnoj podudarnosti testova. Smatra se da je idealna podudarnost ako je k vrednost $>0,81$, skoro idealna podudarnost kada je k od 0,61 do 0,80, prilična podudarnost od 0,41 do 0,60, srednja ili umerena podudarnost od 0,21 do 0,40, beznačajna podudarnost za $<0,20$ i nema podudarnosti za vrednost 0.

U Tabeli 49. prikazana je *Kappa* saglasnost protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2.

Tabela 49. Poređenje saglasnosti protokola prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 protokola

Test i rezultati	protokol prema Bowden i sar. (2008)		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
KV-2 protokol	Pozitivni	137	139
	Negativni	0	6
Ukupno	137	8	145

Na osnovu izračunatih vrednosti dobijena *Kappa* vrednost za protokole prema Bowden-u i KV-2 iznosila je 0,850, što predstavlja skoro idealnu usaglašenost ova dva protokola.

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u pozitivnim i negativnim rezultatima kod dva uzorka, odnosno protokolom prema Bowden-u detektovana su dva pozitivna uzoraka više u odnosu na KV-2. Negativni uzorci u KV-2 protokolu imali su visoke Ct vrednosti (Ct 34,59 i Ct 36,33), odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 50. prikazana je *Kappa* saglasnost između protokola prema Bowden-u i protokola prema Menasherow-u (terenski soj virusa BKK).

Tabela 50. Poređenje saglasnosti protokola Bowden i sar. (2008) i nested PCR protokola Menasherow i sar. (2014)

Test i rezultati	protokol prema Bowden i sar. (2008)		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
protokol prema Menasherow-u (terenski soj virusa)	Pozitivni	127	139
	Negativni	0	6
Ukupno	127	18	145

Utvrđena *Kappa* saglasnost rezultata dobijenih protokolom Bowden i sar. (2008) i protokolom Menasherow i sar. (2014) je iznosila 0,467 što ukazuje na priličnu podudarnost između ova dva protokola. Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima za 12 uzoraka, odnosno protokolom prema Bowden-u genom virusa BKK je detektovan u 12 uzorka više nego protokolom prema Menasherow-u. Negativni uzorci u protokolu prema Menasherow-u imali su visoke Ct vrednosti odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 51. prikazana je *Kappa* saglasnost protokola Bowden i sar. (2008) i komercijalnog real-time PCR testa.

Tabela 51. Poređenje saglasnosti protokola Bowden i sar. (2008) i komercijalnog real-time PCR testa

Test i rezultati	protokol prema Bowden i sar. (2008)		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
komercijalni real-time PCR test	Pozitivni	39	39
	Negativni	0	1
Ukupno	39	1	40

Utvrđena *Kappa* saglasnost protokola prema Bowden-u i komercijalnog real-time PCR testa za terenski soj virusa BKK je iznosila 1, što ukazuje na idealnu usaglašenost ova dva testa. Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da nije postojala neusaglašenost u pozitivnim i negativnim rezultatima između ova dva testa.

U Tabeli 52. prikazana je *Kappa* saglasnost protokola Bowden i sar. (2008) i Terenski Niš.

Tabela 52. Poređenje saglasnosti protokola Bowden i sar. (2008) i Terenski Niš

Test i rezultati	<i>protokol prema Bowden i sar. (2008)</i>		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol Terenski Niš</i>	Pozitivni	138	139
	Negativni	0	6
Ukupno	138	7	145

Na osnovu izračunatih vrednosti dobijena *Kappa* vrednost za protokole prema Bowden-u i Terenski Niš iznosila je 0,919, što predstavlja skoro idealnu usaglašenost ova dva protokola. Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima za jedan uzorak, odnosno protokolom prema Bowden-u genom virusa BKK je detektovan u jednom uzorku više nego protokolom Terenski Niš. Negativan uzorak u protokolu Terenski Niš je imao visoku Ct vrednost odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 53. prikazana je *Kappa* saglasnost između protokola KV-2 i protokola prema Menasherow-u (terenski soj virusa BKK).

Tabela 53. Poređenje saglasnosti protokola KV-2 i nested PCR protokola Menasherow i sar. (2014)

Test i rezultati	KV-2 protokol		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol prema Menasherow-u (terenski soj virusa)</i>	Pozitivni	127	137
	Negativni	0	8
Ukupno	127	18	145

Utvrđena *Kappa* saglasnost rezultata dobijenih KV-2 protokolom i protokolom prema Menasherow-u je iznosila 0,584 što ukazuje na priličnu podudarnost između ova dva protokola. Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima za 10 uzoraka, odnosno KV-2 protokolom genom virusa BKK je detektovan u 10 uzorka više nego protokolom prema Menasherow-u. Uzorci koji nisu detektovani protokolom prema Menasherow-u imali su visoke Ct vrednosti, odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 54. prikazana je *Kappa* saglasnost između protokola KV-2 i komercijalnog real-time PCR testa za terenski soj virusa BKK.

Tabela 54. Poređenje saglasnosti protokola KV-2 i komercijalnog real-time PCR testa

Test i rezultati	KV-2 protokol		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>komercijalni real-time PCR test (terenski soj virusa)</i>	Pozitivni	39	39
	Negativni	0	1
Ukupno	39	1	40

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da nije postojala neusaglašenost u pozitivnim i negativnim rezultatima između ova dva testa. Utvrđena *Kappa* saglasnost KV-2 protokola i komercijalnog real-time PCR testa za terenski soj virusa BKK je iznosila 1, što ukazuje na idealnu usaglašenost ova dva testa.

U Tabeli 55. prikazana je *Kappa* saglasnost između protokola KV-2 i protokola Terenski Niš.

Tabela 55. Poređenje saglasnosti protokola KV-2 i Terenski Niš

Test i rezultati	KV-2 protokol		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol Terenski Niš</i>	Pozitivni	137	138
	Negativni	0	7
Ukupno	138	8	145

Na osnovu izračunatih vrednosti dobijena *Kappa* vrednost za protokole KV-2 i Terenski Niš iznosila je 0,930, što predstavlja skoro idealnu usaglašenost ova dva protokola.

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima kod jednog uzorka, odnosno protokolom Terenski Niš genom virusa BKK je detektovan u jednom uzorku više nego protokolom KV-2. Uzorak koji nije detektovan KV-2 protokolom imao je visoku Ct vrednost odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 56. prikazana je *Kappa* saglasnost između nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i komercijalnog real-time PCR testa.

Tabela 56. Poređenje saglasnosti nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i komercijalnog real-time PCR testa

Test i rezultati	<i>nested PCR protokol prema Menasherow-u (terenski soj virusa)</i>		Ukupno	
	Pozitivni	Negativni		
<i>komercijalni real-time PCR test (terenski soj virusa)</i>	Pozitivni	36	3	39
	Negativni	0	1	1
Ukupno		39	1	40

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima kod tri uzoraka, odnosno komercijalnim real-time PCR testom genom virusa BKK je detektovan u tri uzorka više nego protokolom prema Menasherow-u. Utvrđena *Kappa* saglasnost rezultata dobijenih KV-2 protokolom i protokolom prema Menasherow-u je iznosila 0,375 što ukazuje na srednju ili umerenu podudarnost ova dva testa.

U Tabeli 57. prikazana je *Kappa* saglasnost između nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i protokola Terenski Niš.

Tabela 57. Poređenje saglasnosti nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i Terenski Niš protokola

Test i rezultati	<i>nested PCR protokol prema Menasherow-u (terenski soj virusa)</i>		Ukupno	
	Pozitivni	Negativni		
<i>protokol Terenski Niš</i>	Pozitivni	127	0	127
	Negativni	11	7	18
Ukupno		138	7	145

Na osnovu izračunatih vrednosti dobijena *Kappa* vrednost za nested PCR protokol prema Menasherow i sar. (2014) i Terenski Niš protokol iznosila je 0,527, što predstavlja priličnu usaglašenost ova dva protokola.

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je neusaglašenost u dobijenim rezultatima kod 11 uzoraka, odnosno protokolom Terenski Niš genom virusa BKK je detektovan u 11 uzoraka više nego nested PCR protokolom prema Menasherow-u. Negativni uzorci primenom protokola prema Menasherow-u imali su visoke Ct vrednosti, odnosno nisku koncentraciju virusa BKK.

U Tabeli 58. prikazana je *Kappa* saglasnost između komercijalnog real-time PCR testa i protokola Terenski Niš.

Tabela 58. Poređenje saglasnosti komercijalnog real-time PCR testa i protokola Terenski Niš

Test i rezultati	<i>komercijalni real-time PCR test (terenski soj virusa)</i>		Ukupno	
	Pozitivni	Negativni		
<i>protokol Terenski Niš</i>	Pozitivni	39	0	39
	Negativni	0	1	1
Ukupno		39	1	40

Iz Tabele 58. se vidi da podudarnost u dobijenim rezultatima za svih 40 ispitanih uzoraka ($k=1$) što ukazuje na idealnu podudarnost ova dva protokola.

5.4.9 Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR i nested PCR metode za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK

U Tabeli 59. dat je uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom nested PCR protokola (Menasherow i sar., 2014) i tri real-time PCR protokola za detekciju vakcinalnih sojeva virusa BKK (KV-vac, Vakcinalni Niš protokola i komercijalnog real-time PCR testa) za 185 ispitanih uzoraka (105 uzoraka poreklom od sumnjivih životinja, 40 uzoraka poreklom od vakcinisanih životinja sa kliničkim simptomima posle vakcinacije, 40 uzoraka od vakcinisane teladi).

Tabela 59. Uporedni prikaz rezultata real-time PCR i nested PCR protokola za detekciju vakcinalnih sojeva

Uzorak	Grupa životinja	Ispitano (n)	Menasherow vakcinalni soj		KV-vac		Vakcinalni Niš		Komercijalni real-time PCR test	
			+	-	Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost	Pozitivno n (%)	Srednja Ct vrednost	+	-
Bioptat kože	pre vakcinacije	50	0	50	na	-	0	-	na	na
	nakon vakcinacije	18	0	18	0		0		0	18
Nosni bris	pre vakcinacije	6	0	6	na		0		na	na
	nakon vakcinacije	16	2	14	2 (12,5)	25,88	2 (12,5)	26,78	2	14
	vakcinisana telad	20	1	19	1 (5,0)		1 (5,0)		na	na
Krv	pre vakcinacije	49	0	49	na		0		na	na
	nakon vakcinacije	5	2	4	2 (40,0)	25,46	2 (40)	25,87	2	4
	vakcinisana telad	20	2	18	2 (10,0)		2 (10,0)		na	na
Ukupno	pre vakcinacije	105	0	105	na		0		na	na
	nakon vakcinacije	40	4	36	4 (10,0)	25,64	4 (10,0)	26,10	4	36
	vakcinisana telad	40	3	37	3 (7,5)		3 (7,5)		na	na
Ukupno		185	7	178	7		7 (3,78)		4	36

*na- nije analizirano

Primenom χ^2 testa nije ustanovljena statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka dobijenih primenom različitih protokola za izvođenje real-time PCR metode: protokola Menasherow i sar. (2014), KV-vac, Vakcinalni Niš protokola i komercijalnog real-time PCR testa (χ^2 test 1; $p>0,05$). Primenom t-testa, nije utvrđena statistički značajna razlika između Ct vrednosti dobijenih ispitivanjem istih uzoraka primenom ova tri protokola za izvođenje metode real-time PCR (t-test, $p>0,05$).

5.4.10 Kappa (κ) statistička analiza rezultata dobijenih primenom različitih protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK

Imajući u vidu da ne postoji standardni protokol za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK za određivanje osetljivosti i specifičnosti protokola Vakcinalni Niš urađena je Kappa (κ) saglasnost u cilju utvrđivanja usaglašenosti rezultata dobijenih ovim protokolom sa rezultatima dobijenim protokolom prema Menasherow-u, KV-vac protokolom i komercijalnim real-time PCR testom.

U Tabeli 60. prikazana je Kappa saglasnost između nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i protokola Vakcinalni Niš.

Tabela 60. Poređenje saglasnosti nested PCR protokola prema Menasherow i sar. (2014) i protokola Vakcinalni Niš

Test i rezultati	<i>protokol prema Menasherow-u (vakcinalni soj virusa)</i>		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol Vakcinalni Niš</i>	Pozitivni	7	7
	Negativni	0	178
Ukupno		7	178

Na osnovu izračunatih vrednosti dobijena *Kappa* vrednost za nested PCR protokol prema Menasherow i sar. (2014) i Vakcinalni Niš protokol iznosila je 1, što predstavlja idealnu usaglašenost ova dva protokola.

U Tabeli 61. prikazana je *Kappa* saglasnost između protokola KV-vac i Vakcinalni Niš.

Tabela 61. Poređenje saglasnosti nested PCR protokola KV-vac i Vakcinalni Niš

Test i rezultati	<i>KV-vac</i>		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol Vakcinalni Niš</i>	Pozitivni	7	7
	Negativni	0	73
Ukupno		7	73

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da nije postojala neusaglašenost u pozitivnim i negativnim rezultatima između ova dva protokola. Utvrđena *Kappa* saglasnost protokola KV-vac i Vakcinalni Niš je iznosila 1, što ukazuje na idealnu usaglašenost ova dva protokola.

U Tabeli 62. prikazana je *Kappa* saglasnost između komercijalnog real-time PCR testa i protokola Vakcinalni Niš.

Tabela 62. Poređenje saglasnosti komercijalnog real-time PCR testa i protokola Vakcinalni Niš

Test i rezultati	<i>komercijalni real-time PCR test (vakcinalni soj virusa)</i>		Ukupno
	Pozitivni	Negativni	
<i>protokol Vakcinalni Niš</i>	Pozitivni	4	4
	Negativni	0	36
Ukupno		4	36

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da nije postojala neusaglašenost u pozitivnim i negativnim rezultatima između ova dva testa. Utvrđena *Kappa* saglasnost komercijalnog real-time PCR testa i protokola Vakcinalni Niš je iznosila 1, što ukazuje na idealnu usaglašenost ova dva testa.

Zbirni prikaz uporednih rezultata ispitivanja uzoraka poreklom od životinja obolelih tokom epizootije BKK, vakcinisanih goveda koja su ispoljili kliničke simptome nakon vakcinacije tokom 2016. godine, kao i teladi vakcinisane tokom 2019. godine sa epizootiološkog područja VSI Niš primenom šest različitih PCR protokola (prema Bowden-u, KV-2, KV-vac, Terenski Niš, Vakcinalni Niš i nested PCR protokol prema Menasherow-u) i interpretacija rezultata prikazani su u Prilogu 1.

5.5 EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA EPIZOOTIJE BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ

5.5.1 Prvi slučaj BKK na području R. Srbije

Na području R. Srbije prvi slučaj BKK registrovan je na epizootiološkom području VSI Niš u Pčinjskom okrugu, opština Bujanovac, selo Ljiljance (42°25'57.4" N; 21°48'54.0" E) na gazdinstvu sa osam životinja. Klinički simptomi karakteristični za BKK, povišena temperatura (41,5°C), iscedak iz nosa i očiju, smanjenje mlečnosti, kožni čvorovi na celoj površini tela veličine 0,5 do 2 cm i generalizovana limfadenopatija registrovani su kod jedne životinje (slika 9). Sumnja na BKK postavljena je na osnovu kliničkih simptoma 4. juna, a bolest je potvrđena 7. juna 2016. godine na osnovu molekularnih ispitivanja - detekcijom virusa BKK u bioptatu kožnih čvorova i punoj krvi sumnjive životinje. Dana 7. juna 2016. godine, Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, proglasila je teritoriju opštine Bujanovac zaraženim područjem, a teritoriju Pčinjskog upravnog okruga ugroženim područjem. Registrovano žarište se nalazilo na udaljenosti od oko 28 km od najbližeg žarišta u Severnoj Makedoniji (German, Kriva Palanka) u kojoj se BKK pojavio u aprilu mesecu 2016. godine (slika 13) (OIE², 2016).



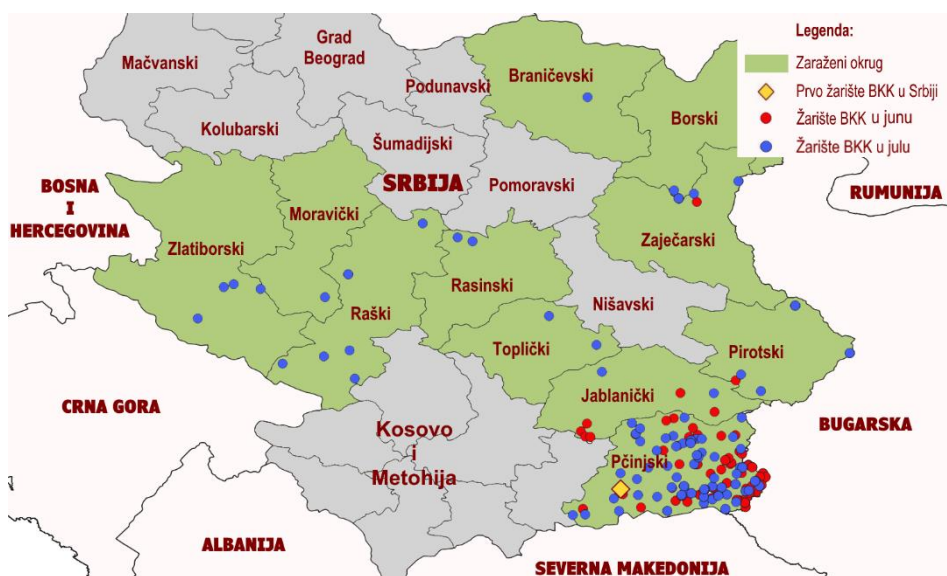
Slika 9. Prvi registrovani slučaj BKK (opština Bujanovac, selo Ljiljance, 7. jun, 2016. godine) (foto: Veterinarski specijalistički institut „Niš“, Niš)

5.5.2 Analiza pojave žarišta BKK i izrada epizootiološke karte (mapirane žarišta)

Epizootija BKK na području R. Srbije trajala je od 7. juna do 1. oktobra 2016. godine i registrovana je u 11 okruga (Slika 12).



Slika 10. Prikaz žarišta BKK u R. Srbiji u junu 2016. godine



Slika 11. Prikaz žarišta BKK u R. Srbiji u junu i julu 2016. godine



Slika 12. Mapa žarišta BKK u R.Srbiji 2016. godine

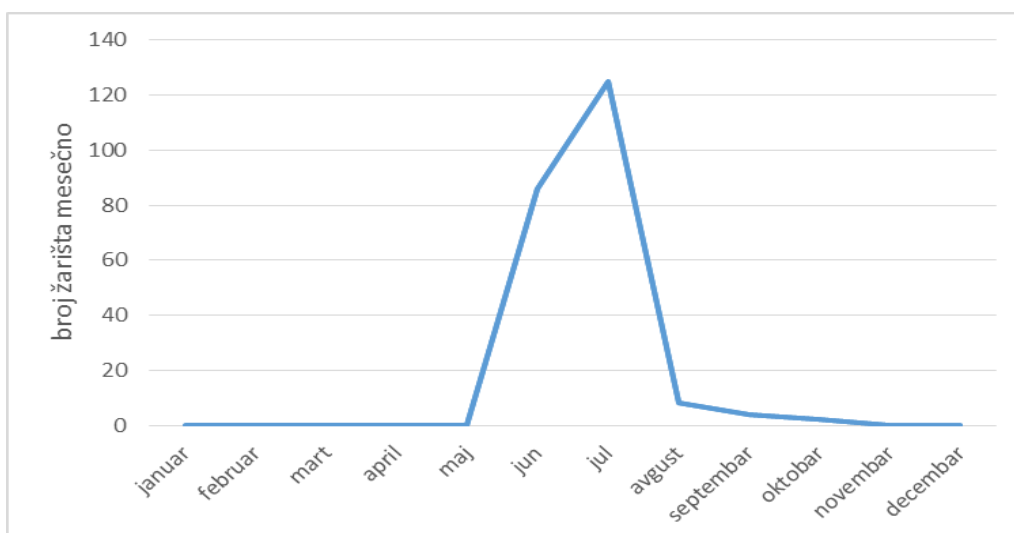
Tokom epizootije BKK na području R. Srbije registrovano je ukupno 225 žarišta od kojih 189 (84%) na epizootiološkom području VSI Niš. Na ovom području tokom juna meseca žarišta BKK su registrovana u tri okruga: Pčinjskom, Jablaničkom i Pirotskom. U julu mesecu BKK je dijagnostikovana i u Topličkom okrugu. Na epizootiološkom području VSI Niš bolest nije dijagnostikovana jedino u Nišavskom okrugu.

Najveći broj žarišta BKK na teritoriji R. Srbije registrovan je na području Pčinjskog okruga (169; 75,1% od ukupno registrovanih žarišta), zatim u Raškom okrugu (17; 7,6%) (epizootiološko područje VSI Kraljevo), Pirotskom okrugu (11; 4,9%), Zaječarskom (9; 4,0%) (VSI Zaječar), Jablaničkom (7; 3,1%) i Zlatiborskom okrugu (5; 2,2%) (VSI Kraljevo). U dva okruga: Topličkom (VSI Niš) i Rasinskom (VSI Kraljevo) registrovano je po 2 žarišta (0,9%), dok je u tri okruga: Braničevskom (VSI Požarevac), Moravičkom (VSI Kraljevo) i Borskom (VSI Zaječar) registrovano po jedno žarište. Najveći broj žarišta BKK registrovan je u opštinama koje se nalaze u pograničnom području sa Severnom Makedonijom i Bugarskom i to u opštini Bosilegrad (n=58) i Trgovište (n=47) (Pčinjski okrug).

Najveći broj žarišta BKK pojavio se tokom juna i jula meseca (n=211). U junu mesecu registrovano je 86 (38,2%) žarišta. Tokom jula meseca registrovan je značajno veći broj žarišta BKK (125; 55,6%) u odnosu na jun (χ^2 test 4,92; $p < 0,05$). Nagli pad broja žarišta registruje se u avgustu (8; 3,6%), septembru (4; 1,8%) i oktobru mesecu (2; 0,9%) u odnosu na juni (χ^2 test 43,15; $p < 0,05$) i juli mesec (χ^2 test 70,22; $p < 0,05$).

Na grafikonu 1. dat je prikaz vremenske distribucije broja žarišta BKK u R. Srbiji po mesecima tokom 2016. godine.

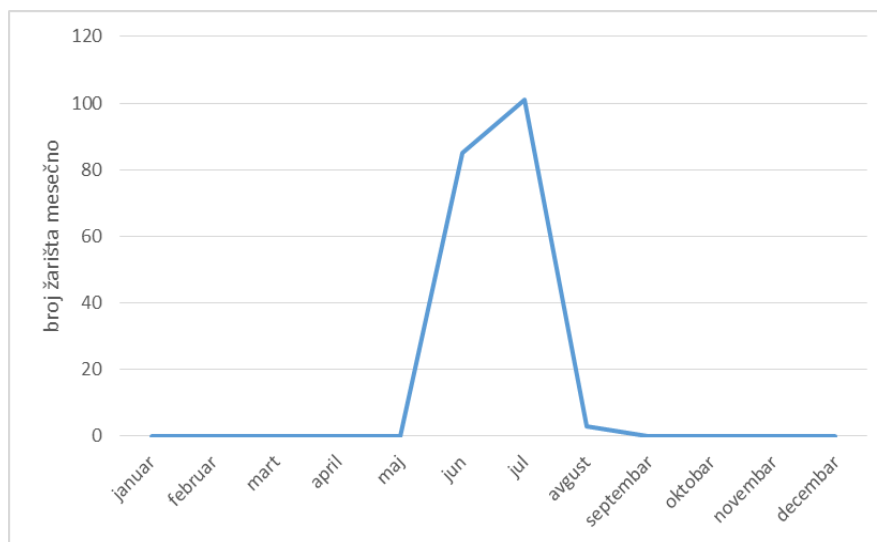
Grafikon 1. Vremenska distribucija broja žarišta BKK u R. Srbiji po mesecima u 2016. godini



Na epizootiološkom području VSI Niš, na kome je epizootija BKK trajala je do 10. avgusta 2016. godine, najveći broj žarišta registrovan je u julu mesecu 53,4% (n=101) i junu mesecu 45,0% (n=85), pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika u broju žarišta registrovanih tokom ova dva meseca (χ^2 test 0,96; $p>0,05$). Međutim, broj žarišta naglo je smanjen tokom avgusta, kada su registrovana samo tri žarišta (1,6%), u odnosu na jun i jul mesec (χ^2 test 63,96; $p<0,05$; χ^2 test 75,54; $p<0,05$). Tokom septembra u ispitivanom području nije prijavljen ni jedan slučaj bolesti.

Na grafikonu 2. dat je prikaz vremenske distribucije broja žarišta BKK na epizootiološkom području VSI Niš.

Grafikon 2. Vremenska distribucija žarišta BKK na epizootiološkom području VSI Niš po mesecima u 2016. godini



Epizootija je najduže trajala u Raškom i Pčinjskom okrugu, a najkraće u okruzima u kojima je registrovan manji broj žarišta (Tabela 63).

Tabela 63. Broj žarišta, prvi i poslednji prijavljeni slučajevi BKK po okruzima u Srbiji tokom epizootije 2016. godine

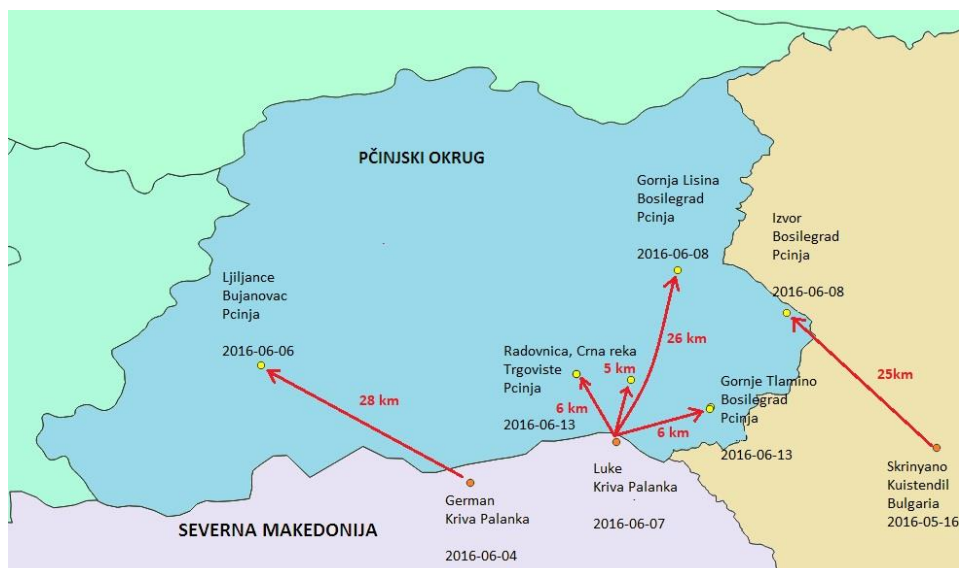
Okrug	Broj žarišta BKK	Prvi prijavljeni slučaj BKK	Poslednji prijavljeni slučaj BKK
Pčinjski	169	07.06.2016	10.08.2016
Raški	17	13.07.2016	01.10.2016
Pirotski	11	26.06.2016	28.07.2016
Zaječarski	9	21.06.2016	13.07.2016
Jablanički	7	13.06.2016	22.07.2016
Zlatiborski	5	21.07.2016	02.08.2016
Toplički	2	13.07.2016	29.07.2016
Rasinski	2	15.07.2016	18.07.2016
Braničevski	1	13.07.2016	13.07.2016
Borski	1	14.07.2016	14.07.2016
Moravički	1	28.07.2016	28.07.2016
Ukupno	225	07.06.2016	01.10.2016

5.5.3 Analiza prostorne i vremenske distribucije epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš

Prostorna i vremenska distribucija epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš je izračunata u programu *Microsoft Office Excel* na osnovu podataka o geografskoj širini/geografskoj dužini lokacije gde je žarište registrovano a na osnovu pretpostavke da svako novo žarište moglo da nastane od prostorno i vremenski najbližeg žarišta. Za vremenski opseg uzet je najduži period inkubacije, tj. period od 1 do 30 dana. Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da se 50% prostorno i vremenski međusobno bliskih žarišta nalazilo na udaljenosti od 1,89 do 8,88 km, sa prosečnom udaljenosti od 4,32 km, dok je prosečno vreme pojave novih žarišta kretalo u vremenskom opsegu od 1 do 29 dana, prosečno 9 dana (Tabela 64). Na osnovu analize prostorne i vremenske distribucije epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš može se pretpostaviti da su prva žarišta u R. Srbiji povezana sa žarištima u Severnoj Makedoniji i Bugarskoj.

Posle pojave prvog žarišta u opštini Bujanovac prijavljena su sekundarna žarišta u Pčinjskom okrugu (opština Bosilegrad), i to u Gornjoj Lisini udaljenoj oko 26 km od najbližeg žarišta u Severnoj Makedoniji (Luke, Kriva Palanka) i Izvoru udaljenom oko 25 km od najbližeg žarišta koje se nalazilo na granici sa Bugarskom (Skrinyano, Ćustendil).

U periodu od pet dana nakon pojave navedenih žarišta registrovana su žarišta u opštini Trgovište: Radovnica i Crna Reka, udaljena 5 km odnosno 6 km od najbližeg žarišta u Severnoj Makedoniji - Luke, Kriva Palanka (slika 13). Na slici 13. dat je prikaz mogućeg ulaska BKK na područje R. Srbije.



Slika 13. Prikaz mogućeg ulaska BKK na teritoriju R. Srbije

Analizom podataka o nadmorskoj visini svih žarišta BKK registrovanih na epizootiološkom području VSI Niš utvrđeno je da su se žarišta javljala na nadmorskoj visini od 260 do 1495 m. Iz Tabele 64. vidi se da je 50% žarišta registrovano na nadmorskoj visini od 782 m do 1234 m, a više od 90% žarišta na nadmorskoj visini većoj od 500 m ($p \leq 0,01$). Prosečna nadmorska visina područja na kojima su registrovana žarišta iznosila je 992 m (Tabela 64).

Tabela 64. Rezultati vremensko-prostorne distribucije pojave žarišta BKK na epizootiološkom području VSI Niš (Manić i sar., 2019)

Parametar	Min	Percentil					Max
		10%	25%	Medijana	75%	90%	
Razdaljina između žarišta (km)	0,028	0,35	1,89	4,32	8,88	24,08	115,01
Vremenski razmak između žarišta (dani)	1	3	5	9	16	23	29
Nadmorske visine (m)	260	526	782	992	1234	1340	1495

5.5.4 Stope morbiditeta, mortaliteta i letaliteta na epizootiološkom području VSI Niš

Tokom epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš prosečna stopa morbiditeta stada iznosila je 13,6%, i kretala se od 0 (Nišavski okrug) do 16,9% (Pčinjski okrug) (Tabela 65). Utvrđeno je da postojala statistički veoma značajna razlika u stopi morbiditeta na području Pčinjskog okruga u odnosu na ostale okruge (χ^2 test 35,18; $p \leq 0,001$). Prosečna stopa mortaliteta stada iznosila je 0,4%, pri čemu je utvrđena statistički veoma značajna razlika u stopi mortaliteta između okruga (χ^2 test 15,55; $p \leq 0,001$) imajući u vidu da je mortalitet registrovan u samo dva okruga Pčinjskom (0,5%) i Jablaničkom okrugu (1,6%). Stopa letaliteta kretala se od 3,1% u Pčinjskom okrugu do 12,5% u Jablaničkom. U Tabeli 65. prikazane su stope morbiditeta, mortaliteta i letaliteta u stadima tokom epizootije BKK na epizootiološkom području VSI Niš.

Tabela 65. Morbiditet, mortalitet i letalitet BKK na epizootiološkom području VSI Niš

Okrug	Populacija goveda u ispitivanom području	Broj žarišta	Broj prijemčivih životinja	Morbiditet u stadu n (%)	Mortalitet u stadu n (%)	Letalitet u stadu n (%)
Pčinjski	22600	169	1149	194 (16,9)	6 (0,5)	6 (3,1)
Pirotski	10318	11	391	16 (4,1)	0	0
Jablanički	24141	7	61	8 (13,1)	1 (1,6)	1 (12,5)
Toplički	12276	2	17	2 (11,8)	0	0
Nišavski	24099	0	0	0	0	0
Ukupno	92988	189	1618	220 (13,6)	7 (0,4)	7 (3,2)
χ^2 test				35,18	15,55	0,80
<i>p</i> -vrednost				<0,001**	<0,001**	0,850 ^{NS}

^{NS} Nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$)

** Statistički veoma značajna razlika ($p \leq 0,001$)

Najviša stopa morbiditeta utvrđena je u kategoriji mlečnih krava (208; 94,55%), u odnosu na telad (6; 2,73%), junice (4; 1,82%) i priplodne i tovne bikove (2; 0,90%) (χ^2 test 39,88; $p \leq 0,01$) (Tabela 66). Mortalitet je zabeležen samo kod mlečnih krava (5; 0,48%) i teladi (2; 0,51). U Tabeli 66. vidi se da je najviša stopa letaliteta utvrđena kod teladi (33,3%) u odnosu na mlečne krave (2,4%) (χ^2 test 15,85; $p < 0,001$). Od ukupno sedam uginulih životinja 5 (71,43%) su pripadale kategoriji mlečnih krava, a uginula su i 2 teleta (χ^2 test 15,85; $p \leq 0,01$).

Tabela 66. Morbiditet i mortalitet prema proizvodnim kategorijama goveda na epizootiološkom području VSI Niš

Proizvodne kategorije	Broj prijemčivih životinja u ispitivanom području (VSI Niš, 2016) n (%)	Morbiditet n (%)	Mortalitet n (%)	Letalitet n (%)
Krave	1038 (64,15)	208 (94,55)	5 (0,48)	5 (2,40)
Telad	393 (24,29)	6 (2,73)	2 (0,51)	2 (33,33)
Priplodni bikovi i bikovi za tov	144 (8,90)	2 (0,90)	0	0
Junice	43 (2,66)	4 (1,82)	0	0
Ukupno	1618	220 (13,6)	7 (0,40)	7 (3,20)
χ^2 test		39,88	0,96	15,85
<i>p</i> -vrednost		<0,001**	0,81 ^{NS}	<0,001**

^{NS} Nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$)

** Statistički veoma značajna razlika ($p \leq 0,001$)

U odnosu na starosne kategorije najviše je obolelih goveda starijih od 5 godina (126; 57,3%), u odnosu na goveda starosti između 2 i 5 godina (45; 20,5%) i životinja mlađih od 2 godine (49; 22,3%) (χ^2 test 56,85; $p \leq 0,01$).

U odnosu na broj životinja u stadu/žarištu utvrđeno je da je BKK u najvećem procentu (50%) registrovana u žarištima sa prosečnim brojem goveda od 3 do 10 (6 životinja) u 28,6% slučajeva u žarištima sa manje od 3, i u 21,4% slučajeva u žarištima sa više od 10 životinja (χ^2 test 19,18; $p \leq 0,01$).

5.6 ANALIZA MERA KONTROLE I SUZBIJANJA BKK NA EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU VSI NIŠ

Mere kontrole i suzbijanja BKK na teritoriji R. Srbije sprovedene su prema Zakonu o veterinarstvu R. Srbije, a u skladu sa direktivom EU 92/119/EC. U Upravi za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine R. Srbije formirani su Nacionalni krizni centar, dok je u VSI Niš formiran Regionalni krizni centar, kao i lokalni krizni centri raspoređeni u pet okruga koji su pod nadzorom VSI Niš (Pčinjski, Jablanički, Pirotski, Toplički i Nišavski).

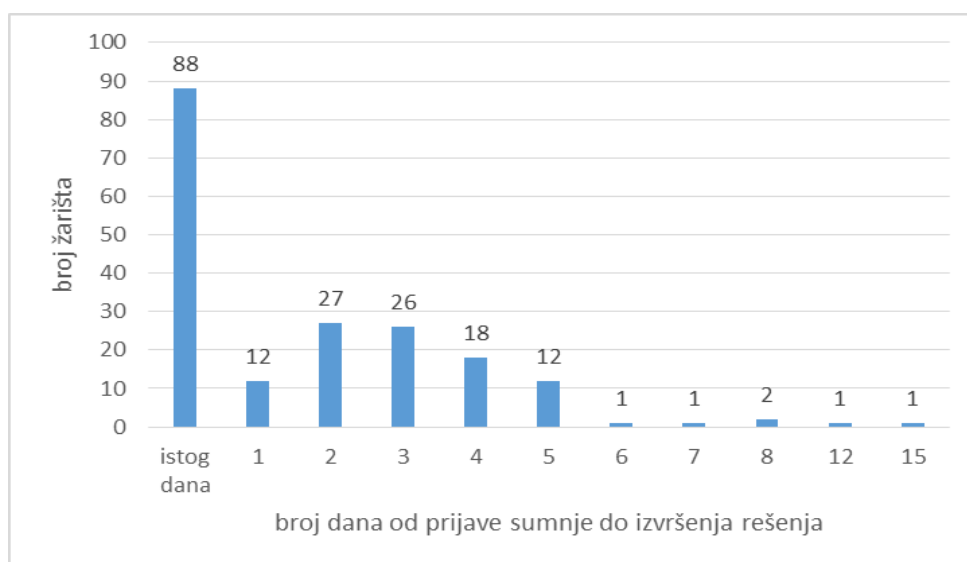
U slučaju kliničke sumnje na BKK vršena je epizootiološka analiza, klinički pregled i uzorkovanje materijala za laboratorijsku dijagnostiku.

5.6.1 Mere suzbijanja BKK pre sprovođenja vakcinacije

Pre početka vakcinacije populacije goveda protiv BKK, nakon prvog laboratorijski potvrđenog slučaja bolesti u naseljenom mestu gde je žarište registrovano, svaki novi klinički slučaj se smatrao pozitivnim na BKK (bez laboratorijske potvrde) i sva goveda u žarištu su bez obzira na zdravstveni status uklanjana primenom *stamping out* metode. Dezinfekcija i dezinsekcija u žarištu su sprovedene istog dana kada i eutanazija i neškodljivo uklanjanje leševa iz žarišta.

Analizom podataka o vremenskom periodu od postavljanja sumnje na BKK do završetka mera suzbijanja (eutanazija, zakopavanje leševa, dezinfekcija i dezinsekcija) za svako žarište, utvrđeno je da je taj period iznosio prosečno 2,2 dana. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da je u 81,0% (153/189) žarišta suzbijanje BKK sprovedeno u periodu do 72h, od toga u 46,6% (88/189) žarišta u periodu do 24h. U samo 19,0% (36/189) žarišta mere suzbijanja su sprovedene posle 72 sata. Najduži vremenski period od postavljanja sumnje do sprovođenja mera suzbijanja BKK (15 dana) registrovan je u jednom žarištu (Grafikon 3).

Grafikon 3. Broj dana od postavljanja sumnje na BKK do sprovođenja stamping out metode u žarištima u istraživanom području



5.6.2 Mere kontrole i suzbijanja nakon vakcinacije

Na području R. Srbije vakcinisano je ukupno 875380 goveda (99,7% od ukupne populacije goveda na području R. Srbije). Na epizootiološkom području VSI Niš ukupno je vakcinisano 92760 (10,6%) u odnosu na broj goveda u R.Srbiji sa obuhvatom vakcinacije od 100%. Prema hitnosti vakcinacije teritorija R. Srbije je podeljena na tri zone. Zona A obuhvatala je dva okruga sa epizootiološkog područja VSI Niš - Pčinjski i Jablanički okrug gde je vakcinacija započeta 24.06.2016. godine, a završena 11.07.2016. godine. Zonu B su činila tri okruga koja se nalaze na

epizootiološkom području VSI Niš (Pirotski, Toplički i Nišavski okrug) gde je vakcinacija započeta 27.06.2016. godine, a završena 25.07.2016. godine. Preostali deo R. Srbije je činio zonu C.

Nakon sprovođenja vakcinacije u cilju suzbijanja BKK u žarištu sprovodio se *stamping out* samo životinja sa ispoljenim kliničkim simptomima bolesti.

Tokom suzbijanja BKK u R. Srbiji ukupno je eutanazirano 709 goveda, pre početka vakcinacije 567 (80,0%) i tokom vakcinacije 142 (20,0%). Na epizootiološkom području VSI Niš ukupno je eutanazirano 603 grla goveda (84,5% od ukupnog broja eutanaziranih goveda na teritoriji R. Srbije). Pre početka vakcinacije eutanazirano je 87,6% životinja, odnosno 87,3% nakon početka vakcinacije u odnosu na ukupan broj eutanaziranih životinja na teritoriji R. Srbije. Pre početka vakcinacije na epizootiološkom području VSI Niš eutanaziran je značajno veći broj goveda (479; 79,44%), u odnosu na period posle vakcinacije (124; 20,56%), (χ^2 test 244,71, $p \leq 0,001$) (Tabela 67).

Tabela 67. Broj žarišta BKK i broj eutanaziranih životinja pre i posle početka vakcinacije na epizootiološkom području VSI Niš

Okrug		Početak vakcinacije		χ^2 test	p-vrednost	Ukupno
		Pre	Posle			
Pčinjski	Žarište	83	86	0,05	0,818 ^{NS}	169
	Eutanazirano	421	105	221,62	<0,001**	526
Jablanički	Žarište	5	2	1,29	0,257 ^{NS}	7
	Eutanazirano	37	2	34,91	<0,001**	39
Pirotski	Žarište	2	9	4,46	0,035*	11
	Eutanazirano	21	15	1,66	0,198 ^{NS}	36
Toplički	Žarište	0	2	2,00	0,157 ^{NS}	2
	Eutanazirano	0	2	1,82	0,178 ^{NS}	2
Nišavki	Žarište	0	0	-	-	0
	Eutanazirano	0	0	-	-	0
Ukupno	Žarište	90	99	0,43	0,513 ^{NS}	189
	Eutanazirano	479	124	244,71	<0,001**	603

^{NS} Nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

* Statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$).

** Statistički veoma značajna razlika ($p \leq 0,001$).

Na epizootiološkom području VSI Niš poslednji slučajevi BKK dijagnostikovani su 10. avgusta 2016. godine u dva žarišta koja su registrovana u Pčinjskom okrugu, u jednom žarištu devetog, a u drugom tridesetog dana posle završene vakcinacije. Mesec dana nakon završetka vakcinacije na epizootiološkom području VSI Niš nije registrovan ni jedan slučaj bolesti.

5.6.3 Pojava kliničkih simptoma kod goveda nakon vakcinacije protiv BKK

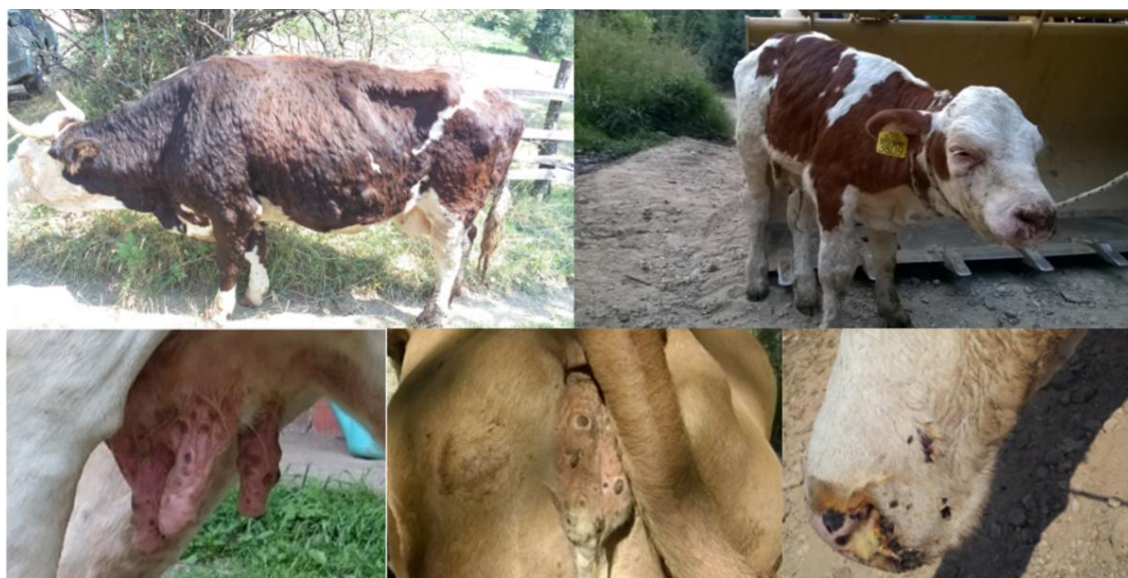
Na području VSI Niš postvakcinalne komplikacije nisu sistemski praćene. Klinički simptomi nakon vakcinacije zabeleženi su kod 124 goveda (0,13% od ukupnog broja vakcinisanih na ispitivanom području). Utvrđeno je da su se klinički simptomi javljali u periodu od 1 do 30 dana posle vakcinacije, (prosečno 8,77 dana $SD \pm 5,45$). Sve životinje koje su pokazivale kliničke simptome nakon vakcinacije su eutanazirane. U Tabeli 68. dati su klinički simptomi koji su se javljali kod vakcinisanih životinja, a na slici 14. su prikazane životinje sa karakterističnim kliničkim simptomima bolesti sa epizootiološkog područja VSI Niš.

Iz Tabele 68. se vidi da je u 95,2% slučajeva registrovana povišena telesna temperatura sa difuzno raspoređenim čvorovima po koži, kod 46,8% čvorovi su registrovani na vimenu, a kod 43,5% slučajeva na vulvi. Pad mlečnosti je registrovan u 28,2%, a iscedak iz nosa u 20,0% slučajeva. Otok ekstremiteta registrovan je u 15,3% slučajeva, a ulcerozne promene i kraste kao i pojava dijareje u 1,6 % slučajeva.

Tabela 68. Klinički simptomi kod životinja nakon sprovedene vakcinacije (područje VSI Niš)

Klinički simptomi	Broj životinja (n)	%
Opšta slabost i smanjen apetit	110	88,7
Povišena telesna temperatura i kožni čvorovi difuzno raspoređeni po celom telu	118	95,2
Čvorovi na vimenu	58	46,8
Čvorovi na vulvi	54	43,5
Lokalizovani kožni čvorovi	6	4,8
Pad mlečnosti	35	28,2
Iscedak iz nosa	25	20,2
Otok ekstremiteta	19	15,3
Ulcerozne promene i kraste po telu i dijareja	2	1,6

Primenom real-time PCR protokola prema Bowden i sar. (2008), KV-2 protokola (Vidanović i sar., 2016) i nested PCR protokola (Menasherow i sar., 2014), Terenski Niš, Vakcinalni Niš, KV-vac i komercijalnim real-time PCR testom ispitano je 40 uzoraka (18 uzoraka bioptata kože, 6 uzoraka krvi i 16 uzoraka nosnih briseva) od 16,1% (20/124) goveda kod kojih su se klinički simptomi pojavili nakon vakcinacije. Kod svih životinja pregledom navedenih uzoraka registrovano je prisustvo terenskog ili koinfekcija terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK (rezultati molekularnih ispitivanja prikazani su u delu 5.3).



Slika 14. Klinički simptomi BKK kod goveda na epizootiološkom području VSI Niš (foto: VSI „Niš“, Niš) (Manić i sar., 2019)

6. DISKUSIJA

Bolest kvrgave kože (BKK) je infektivno oboljenje goveda koje je do 2012. godine bilo ograničeno na region afričkog kontinenta. U periodu između 2012. i 2014. godine BKK se pojavila u većini zemalja Bliskog Istoka, Turskoj i delu Kipra (EFSA, 2015; Tuppurainen i Oura, 2014). U avgustu 2015. godine BKK se prvi put pojavila na području Evrope. U R. Srbiji BKK je prvi put utvrđena u junu 2016. godine u Pčinjskom okrugu (selu Ljiljance, opština Bujanovac). Prvi registrovani slučaj bolesti je dijagnostikovao na osnovu epizootioloških podataka, kliničkih simptoma i laboratorijskih ispitivanja uzoraka primenom real-time PCR metode (Manić i sar., 2019).

Izolacija virusa BKK na kulturi ćelija i identifikacija virusa primenom klasičnih virusoloških (virus neutralizacija) i molekularnih metoda predstavljaju standardnu proceduru za dijagnostiku BKK (OIE¹, 2018). Tokom epizootije u R. Srbiji iz uzoraka obolelih životinja sa epizootiološkog područja VSI Niš izolovan je virus BKK, a izolovani soj dobio je naziv *Serbia/Bujanovac/2016*. Nakon izolacije urađeno je sekvenciranje kompletnog genoma (Toplak i sar., 2017) i soj *Serbia/Bujanovac/2016* je deponovan u banci gena (*GenBank*) u kojoj se trenutno nalazi još 13 kompletnih genoma virusa BKK izolovanih iz različitih delova sveta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

Laboratorijska dijagnostika BKK se pored klasičnih metoda virusološke dijagnostike (izolacija virusa i VNT), danas prvenstveno zasniva na molekularnim metodama, kao što su konvencionalni PCR i real-time PCR (OIE¹, 2018; Haegemen i sar., 2019). U poređenju sa klasičnim metodama, prednost molekularnih metoda ogleda se u njihovoj visokoj osetljivosti i specifičnosti, relativno brzom izvođenju, mogućnosti analize velikog broja uzoraka i ispitivanju uzoraka koji nisu podesni za izolaciju virusa (Haegeman i sar., 2019).

Tokom izrade doktorske disertacije izvršena je izolacija virusa BKK na kulturi ćelija (MDBK) iz kliničkih uzoraka goveda sa epizootiološkog područja VSI Niš. Izolacija je bila uspešna nakon druge pasaže iz jednog uzorka bioptata kože goveda (10%; 1/10), iako je genom virusa BKK detektovan molekularnim metodama (real-time PCR) u svim uzorcima (100%; 10/10). Značajno niža osetljivost metode izolacije virusa u odnosu na molekularne metode opisana je i u drugim studijama (Babiuk i sar., 2008a). Dobijeni izolat je potvrđen VNT i primenom dva protokola za izvođenje real-time PCR metode Bowden i sar. (2008) i KV-2. Izolovani virus je dobio naziv *Pčinj 1* i drugi je izolat virusa BKK sa epizootiološkog područja VSI Niš.

U cilju molekularne karakterizacije izolovanog virusa (*Pčinj 1*), i virusa detektovanih molekularnim metodama iz šest uzoraka bioptata kože goveda izvršeno je sekvenciranje delova četiri gena (RPO30, GPCR, EEV i P32) metodom po Sangeru (Sanger i sar., 1977). Sekvenciranjem su dobijene sekvence dužine 780 bp za RPO30 gen, 760 bp za GPCR, 664 bp za EEV i 681 bp za P32 gen. Poređenjem nukleotidnih sekvenci četiri gena izolovanog soja *Pčinj 1* sa analognim sekvencama šest identifikovanih virusa BKK utvrđena je podudarnost u redosledu nukleotida od 100%, takođe podudarnost u redosledu nukleotida od 100% utvrđena je poređenjem nukleotidnih sekvenci četiri gena izolovanog soja *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK sa analognim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016*.

Imajući u vidu potpunu podudarnost soja *Pčinj 1*, virusa detektovanih u šest uzoraka bioptata kože i soja *Serbia/Bujanovac/2016* prilikom izrade filogenetskog stabla korišćen je soj *Serbia/Bujanovac/2016*. Filogenetsko stablo obuhvatilo je pored soja *Serbia/Bujanovac/2016* i 19 CaPV registrovanih u banci gena (*GenBank*), čija je podudarnost nukleotidnih sekvenci delova gena RPO30, GPCR, EEV i P32 sa analognim nukleotidnim sekvencama soja *Serbia/Bujanovac/2016* bila od 99 do 100%. Uprkos visokoj podudarnosti u redosledu nukleotida između CaPV (Tulman i sar., 2002) filogenetska analiza na osnovu RPO30, GPCR, EEV i P32 gena pokazala je da se svi CaPV svrstavaju u tri grupe/klastera koje čine SPPV,

GTPV i virus BKK, pri čemu se jasno uočava da se u okviru grupe virusa BKK, nalaze dve podgrupe u koje se grupišu terenski i vakcinalni sojevi virusa BKK (Mafirakureva i sar., 2017; Adedeji i sar., 2019; Sameea Yousefi i sar., 2018; Molini i sar., 2018).

Filogenetskom analizom utvrđeno je da se virus *Serbia/Bujanovac/2016* nalazi u podgrupi sa ostalim terenskim sojevima virusa BKK koji su izolovani u različitim delovima sveta: Grčkoj (*Evros/GR/15*), Ruskoj Federaciji (*Dagestan/2015*), Izraelu (*155920/2012*) i Južnoj Africi (*Neethling Warmbaths LW*) sa podudarnošću u redosledu nukleotida od 100%. Dobijeni rezultati ukazuju da je virus BKK visoko konzerviran (Tulman i sar., 2001). Međutim, u Turskoj je na osnovu upoređivanja GPCR gena 37 terenskih sojeva virusa izolovanih u različitim regionima utvrđena podudarnost u redosledu nukleotida od 99,8% i 100%, što ukazuje da je u periodu 2014/15 godine na području Turske cirkulisalo više od jednog soja virusa (Sevik i Dogan, 2016). Takođe, uvidom u filogenetska stabla, utvrđen je niži stepen podudarnosti analognih sekvenci RPO30, GPCR, EEV i P32 gena virusa *Serbia/Bujanovac/2016*, *Pčinj 1* i šest identifikovanih virusa BKK u odnosu na vakcinalne sojeve (*SIS-Lumpyvac vaccine*, *Neethling Herbivac vaccine* i *Neethling-LSD vaccine OBP*) koji se koriste za vakcinaciju goveda na području R. Srbije. Ova činjenica ukazuje na mogućnost upotrebe gena RPO30, GPCR, EEV i P32 terenskih sojeva za pripremu i standardizaciju molekularnih dijagnostičkih testova kojima se mogu razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa.

Pored visokog stepena konzerviranosti genoma virusa BKK određene studije ukazale su na mogućnost rekombinacije virusa BKK. U Ruskoj Federaciji izolovan je virus BKK (*LSDV/Russia/Saratov/2017*), za koji postoje izveštaji da je u pitanju rekombinantni soj (Sprygin i sar., 2018b). Na osnovu RPO30, GPCR i P32 gena na filogenetskom stablu urađenom u ovoj doktorskoj disertaciji ovaj soj se izdvaja u posebnu podgrupu koja se nalazi između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa, pri čemu je filogenetskom analizom utvrđena podudarnost u redosledu nukleotida od 100% navedenog soja sa vakcinalnim, odnosno 99,99% sa terenskim sojevima virusa. Međutim, na osnovu EEV gena soj *LSDV/Russia/Saratov/2017* se nalazi u podgrupi sa vakcinalnim sojevima virusa BKK.

Filogenetsko stablo i filogenetska analiza zasnovana na poređenju celog genoma soja *Serbia/Bujanovac/2016* sa celim genomima drugih CaPV (BKK, SPPV, CPPV) koji se nalaze u banci gena (*GenBank*) pokazali su da se soj izolovan na području R. Srbije nalazi u podgrupi sa terenskim sojevima virusa BKK iz drugih delova sveta. Najveća podudarnost u redosledu nukleotida celog genoma soja *Serbia/Bujanovac/2016* od 99,99% utvrđena je sa grčkim sojem *Evros/GR/15*, a najniži stepen podudarnosti od 99,07% sa sojem *LSDV/Rusija/Saratov/2017*, pri čemu se ovaj soj na filogenetskom stablu izdvaja u posebnu podgrupu koja se nalazi između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa BKK (Manić i sar., 2019). Niži stepen podudarnosti u redosledu nukleotida soja *Serbia/Bujanovac/2016* utvrđen je sa vakcinalnim sojevima virusa BKK (98,87% u odnosu na soj *SIS-Lumpyvac vaccine* i soj *Neethling-Herbivac vaccine* i 98,88% u odnosu na soj *Neethling-LSD vaccine-OBP*). Pored toga što se filogenetskom analizom na osnovu upoređivanja celih genoma virusa dobijaju detaljnije informacije o nukleotidnoj podudarnosti između sojeva, u odnosu na filogenetsku analizu koja je zasnovana na sekvenci dela gena, sekvenciranje delova gena ima veliki značaj u dijagnostici jer je na taj način moguće za kraće vreme genetski okarakterisati izolovani virus što je važno u molekularnoj epizootologiji, kao i pripremi određenih dijagnostičkih testova (Manić i sar., 2019).

Početak epizootije BKK na području jugoistočne Evrope, preporučena metodologija za dijagnostiku BKK zasnivala se na primeni real-time PCR protokola (Bowden i sar. 2008) i konvencionalnog PCR protokola (Ireland i Binopal, 1998) (OIE¹, 2018). Uporednim ispitivanjem rezultata dobijenih primenom navedenih protokola utvrđena je veća osetljivost protokola za izvođenje real-time PCR metode u odnosu na konvencionalni PCR (Stubbs i sar., 2012). Nedostatak protokola prema Bowden i sar. (2008) je u tome što je on specifičan za sve kapripoksviruse, i njime nije moguće razlikovati terenske od vakcinalnih sojeva virusa BKK. U zemljama u kojima su prisutne boginje ovaca i koza radi diferencijacije virusa BKK od SPPV i

GTPV korišćeni su specifični protokoli. U Grčkoj je korišćen konvencionalni PCR - protokol prema Lamien i sar. (2011a) koji kao target region ima GPCR gen (Agianniotaki i sar., 2017b), dok je u Turskoj korišćen real-time PCR protokol prema Gelaye i sar. (2013) koji kao target region ima RPO30 gen (Sevik i Dogan, 2017).

Imajući u vidu da boginje ovaca i koza nisu prisutne u R. Srbiji, i nije rađena vakcinacija goveda protiv BKK, na početku epizootije utvrđivanje prisustva genoma virusa BKK u kliničkim uzorcima zasnivalo se na primeni protokola za real-time PCR Bowden i sar. (2008). Tokom trajanja epizootije u NRL za kapripoksviruse R. Srbije razvijen je real-time PCR protokol KV-2, kojim se detektuju samo terenski sojevi virusa BKK (Vidanović i sar., 2016). Pored R. Srbije KV-2 protokol je korišćen u dijagnostici BKK i u zemljama u okruženju (Crna Gora, Bosna i Hercegovina) (Petrović i sar., 2017).

Primenom protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2 ispitano je 233 uzoraka (167 uzoraka od goveda sa kliničkim simptomima ispoljenih pre vakcinacije - 77 uzoraka pune krvi, 82 bioptata kože, 8 nosnih briseva i 66 uzoraka pune krvi goveda bez kliničkih simptoma koje su bile u kontaktu sa obolelim životinjama).

Primenom oba real-time PCR protokola genom virusa BKK je detektovan u najvećem procentu (87,8%) u biopstatima kože u kojima je utvrđena i najveća koncentracija virusa što se može objasniti činjenicom da je virus moguće detektovati u kožnim čvorovima i do 92 dana nakon infekcije (Sprygin i sar., 2018a; Zeynalova i sar., 2016; Tuppurainen i sar., 2005). Imajući u vidu kratku viremiju (6 do 15 dana) (Babiuk i sar., 2008a; Tuppurainen i sar., 2005), nalaz visokog procenta pozitivnih uzoraka krvi (>70%), koji je bio značajno veći u odnosu na nalaze dobijene ispitivanjima u Ruskoj Federaciji (13%) i Azerbejdžanu (40%) (Sprygin i sar., 2018a; Zeynalova i sar., 2016) može ukazivati na činjenicu da su uzorci krvi uzimani u ranoj fazi infekcije. I pored malog broja pregledanih nosnih briseva (n=8) virus BKK je utvrđen u 62,5% uzoraka, pri čemu je poznato da se virus BKK može detektovati u nosnim brisevima u niskim koncentracijama u kratkom vremenskom periodu (od 12-18 dana nakon infekcije) (Babiuk i sar., 2008a). Dobijeni rezultati ukazuju da je u cilju sigurne dijagnoze potrebno ispitati više vrsta uzoraka, kako od životinja sa ispoljenim kliničkim simptomima, tako i od životinja koje su bile u kontaktu sa obolelim, a imajući u vidu da je jedan pozitivan uzorak krvi poticao od životinje bez ispoljenih kliničkih simptoma. Visoka usaglašenost rezultata dobijenih primenom oba protokola (k=0,850) ukazuju na pouzdanu laboratorijsku dijagnostiku BKK na području R. Srbije.

S obzirom da je na području R. Srbije uvedena vakcinacija goveda vakcinom protiv BKK koja sadrži *Neethling* soj virusa (OBP, Južna Afrika) za koju postoje podaci da može dovesti do blagih ili sistemskih reakcija kod vakcinisanih životinja (Ben-Gera i sar., 2015; Abutarbush i sar., 2016; Katsoulos i sar., 2017; Bedeković i sar., 2018), u cilju razlikovanja infekcije od postvakcinalnih komplikacija bila je neophodna primena dijagnostičkih testova kojima je moguće razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK. Do pojave epizootije na području jugoistočne Evrope protokol za izvođenje nested PCR metode prema Menasherow i sar. (2014) je bio jedini dostupan protokol kojim je bilo moguće napraviti razliku između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa BKK u ispitujućim uzorcima (Haegeman i sar., 2019). Imajući u vidu da se protokolom prema Bowden i sar. (2008) detektuju svi CaPV i terenski i vakcinalni soj virusa BKK, nakon početka vakcinacije u cilju dijagnostike korišćen je pored KV-2 protokola i nested PCR prema Menasherow i sar. (2014).

U cilju procene specifičnosti i osetljivosti nested PCR (Menasherow i sar., 2014), kao i značaja ovog protokola u dijagnostici BKK ispitani su uzorci poreklom od goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima pre vakcinacije, kao i 40 uzoraka poreklom od 20 goveda sa simptomima ispoljenim posle vakcinacije. Ispitivanjem uzoraka krvi, bioptata kože i nosnih briseva goveda sa kliničkim simptomima koji su se ispoljili posle vakcinacije primenom protokola prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 u 97,5% (39/40) uzoraka poreklom od svih 20 goveda utvrđeno je prisustvo terenskog soja virusa BKK, a jedan uzorak (uzorak nosnog brisa) je bio negativan. Međutim,

nested PCR testom (Menasherow i sar., 2014) terenski soj virusa detektovan je u 36 uzoraka, u tri uzorka detektovani su terenski i vakcinalni soj virusa BKK (što je ukazuje da su goveda vakcinisana u periodu inkubacije), a kod jedne životinje (u uzorku nosnog brisa) detektovan je samo vakcinalni soj virusa u kome je KV-2 protokolom detektovan terenski soj virusa sa visokom Ct vrednosti. Dobijeni rezultati ukazuju da je životinja prilikom vakcinacije verovatno bila u fazi viremije, a da je koncentracija DNK terenskog soja virusa bila niska tako da nije detektovana protokolom prema Menasherow-u.

Na osnovu dobijenih rezultata, primenom *Kappa* statističke analize utvrđena je prilična usaglašenost protokola Bowden i sar. (2008) i KV-2 sa nested PCR protokolom ($k=0,467$ i $k=0,584$). Utvrđena specifičnost nested PCR protokola (Menasherow i sar., 2014) u odnosu na real-time PCR protokole prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 iznosila je 100%, a osetljivost 91,37%, odnosno 92,70%. I pored visoke specifičnosti, niža osetljivost, kao i činjenice da je postupak izvođenja složen i dugotrajan, nested PCR ne predstavlja metodu izbora za brzu dijagnostiku BKK (Vidanović i sar., 2016; Stubbs i sar., 2012).

Do epizootije BKK na teritoriji Evrope nije bilo komercijalno dostupnih PCR testova. Jedan od prvih koji se pojavio na tržištu bio je DIVA PCR test (*Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease - DIVA*, Biosellal, Francuska) pri čemu u trenutku našeg istraživanja nije postojala validaciona studija sprovedena od strane proizvođača. Validaciona studija za navedeni test je u međuvremenu urađena prema francuskom standardu (U47-600-2) i test je implementiran i akreditovan u Francuskoj (Pelletier i sar., 2018). U cilju provere prisustva terenskog i/ili vakcinalnog soja virusa BKK ovim testom je ispitano 40 uzoraka poreklom od 20 životinja kod kojih su se klinički simptomi ispoljili nakon vakcinacije. Sprovedenim ispitivanjem terenski soj virusa je utvrđen u 39 uzoraka, pri čemu je u četiri uzorka istovremeno detektovan i vakcinalni soj virusa BKK. Upoređujući rezultate dobijene protokolom prema Bowden i sar. (2008) i KV-2 protokola sa komercijalnim real-time PCR testom primenom *Kappa* statističke analize utvrđeno je da je između ovih protokola postojala idealna usaglašenost ($k=1$). U odnosu na protokol prema Bowden i sar. (2008) osetljivost i specifičnost komercijalnog real-time PCR testa iznosila je 100% (Pelletier i sar., 2018). Međutim, upoređujući rezultate dobijene protokolom prema Menasherow i sar. (2014) i komercijalnim real-time PCR testom za terenski soj virusa utvrđena je srednja ili umerena usaglašenost ($k=0,375$) u dobijenim rezultatima, ukazujući da je protokol prema Menasherow-u za detekciju terenskog soja virusa BKK manje osetljiv od komercijalnog PCR testa. Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata može se zaključiti da je komercijalni real-time PCR test pouzdan, međutim, obzirom na cenu prednost imaju real-time PCR protokoli.

Pojava epizootije BKK u Evropi, kao i masovna vakcinacija goveda atenuiranim vakcinom uticali su da se pored real-time PCR protokola (Bowden i sar., 2008), konvencionalnog PCR protokola (Ireland i Binopal, 1998) (OIE¹, 2018) i nested PCR protokola (Menasherow i sar., 2014) intenzivira priprema i standardizacija specifičnijih i osetljivijih protokola kojima se brzo i sa velikom sigurnošću može dijagnostikovati BKK i omogućiti razlikovanje terenskog od vakcinalnog soja virusa. Od 2016. godine pripremljeno je i standardizovano više real-time PCR protokola za detekciju terenskih sojeva BKK (Vidanović i sar., 2016; Pestova i sar., 2018) ili DIVA protokola (Agianniotaki i sar., 2017b; Agianniotaki i sar., 2017c), a većina protokola zasniva se na razlikama u EEV, RPO30 ili GPCR genu između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa BKK.

U cilju razlikovanja terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK tokom izrade doktorske disertacije pripremljen je i standardizovan real-time PCR protokol za detekciju terenskog soja virusa BKK – koji je nazvan Terenski Niš i čije se sekvence prajmera i probe zasnivaju na razlikama (*mismatches*) u redosledu nukleotida terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK na LSD008 genu. U cilju validacije protokola Terenski Niš ispitane su analitičke i dijagnostičke performanse pripremljenog protokola, pri čemu je utvrđena visoka efikasnost (99,66%) (TFS, 2016), dobra analitička osetljivost (0,4 TCID₅₀/ml), zadovoljavajuća ponovljivost, reproduktivnost, robusnost,

kao i odsustvo unakrsne reaktivnosti. Ispitivanjem analitičke specifičnosti utvrđeno je da se protokolom Terenski Niš uspešno mogu razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK. Međutim, imajući u vidu da su ovim protokolom dobijeni pozitivni rezultati na sedam uzoraka virusa boginja ovaca (SPPV) i četiri uzoraka virusa boginja koza (CPPV), utvrđeno je da pripremljen i standardizovan protokol nije specifičan samo za terenske sojeve virusa BKK, već se ovim protokolom detektuju i ostali kapripoksvirusi.

Utvrđeno je da je specifičnost protokola Terenski Niš u odnosu na protokol prema Bowden i sar. (2008) 100%, a osetljivost 99,28%, pri čemu je utvrđen samo jedan lažno negativan uzorak koji je imao visoku Ct vrednost, odnosno nisku koncentraciju virusa BKK. Primenom *Kappa* statističke analize utvrđena je idealna usaglašenost ova dva real-time PCR protokola ($k=0,919$), kao i idealna usaglašenost protokola Terenski Niš i KV-2 ($k=0,930$). Upoređujući Ct vrednosti dobijene protokolom Terenski Niš, Bowden i sar. (2008) i KV-2 (t-test, $p>0,05$), utvrđeno je da sva tri real-time PCR protokola imaju slične dijagnostičke performanse. Takođe, idealna usaglašenost ($k=1$) utvrđena je i u odnosu na komercijalni real-time PCR test.

Poređenjem rezultata dobijenih nested PCR protokolom prema Menasherow i sar. (2014) i protokolom Terenski Niš ustanovljena je manja podudarnost ($k=0,527$), u odnosu na rezultate dobijene protokolima za real-time PCR. Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da je protokolom Terenski Niš genom virusa BKK detektovan u 11 uzoraka više (χ^2 test 5,30; $p<0,05$), pri čemu su svi uzorci imali visoke Ct vrednosti, odnosno nisku koncentraciju virusa, što ukazuje na nižu analitičku osetljivost nested PCR protokola. Protokol Terenski Niš ima prednost u odnosu na nested PCR ne samo u pogledu jednostavnosti izvođenja i tumačenja rezultata, već i u pogledu veće osetljivosti protokola jer se njime, za razliku od nested PCR detektuju i slabo pozitivni uzorci.

Na osnovu sprovedenih ispitivanja utvrđeno je da se protokol Terenski Niš može koristiti u dijagnostici BKK u zemljama gde je bolest prisutna i gde se primenjuje vakcina od *Neethling* soja virusa, ali gde nisu prisutne boginje ovaca i koza i ne koristi se vakcina protiv boginja ovaca za vakcinaciju goveda protiv BKK.

Do pojave epizootije na teritoriji Evrope vakcinalni soj virusa BKK je mogao da se detektuje samo nested PCR protokolom prema Menasherow i sar. (2014). Poslednjih godina razvijeni su DIVA PCR protokoli kojima se omogućava razlikovanje vakcinalnih od terenskih sojeva virusa BKK čija je primena od suštinskog interesa za efikasan nadzor prilikom sprovođenja eradikacije i vakcinacije (Menasherow i sar., 2016; Agianniotaki i sar., 2017c). Do danas je objavljen jedan real-time PCR protokol koji je specifičan samo za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK, a kojim se detektuje deo LSDV008 gena vakcinalnih sojeva (Sprygin i sar., 2018c). NRL za kapripoksviruse R. Srbije razvila je i validovala protokol specifičan za detekciju vakcinalnog soja virusa BKK (KV-vac), koji se takođe zasniva na razlikama na LSDV008 genu između terenskih i vakcinalnih sojeva virusa (podaci nisu objavljeni).

Imajući u vidu nedostatak protokola za detekciju vakcinalnog soja virusa, tokom izrade ove doktorske disertacije, razvijen je protokol za detekciju vakcinalnog soja virusa (Vakcinalni Niš) čije se sekvence prajmera i probe zasnivaju na razlikama (*mismatches*) u redosledu nukleotida između terenskog i vakcinalnog soja virusa BKK na LSD146 genu.

U procesu validacije protokola Vakcinalni Niš utvrđeno je da pripremljeni protokol ima adekvatnu efikasnost (98,84%) (TFS, 2016), dobru analitičku osetljivost (0,2 TCID₅₀/ml), analitičku specifičnost, ponovljivost, reproduktivnost i robusnost, kao i odsustvo unakrsne reaktivnosti sa drugim mikroorganizmima što daje mogućnost da ovaj protokol nađe svoju primenu u drugim laboratorijama. Ispitivanja analitičke specifičnosti su pokazala da se protokolom Vakcinalni Niš razlikuju terenski od vakcinalnih sojeva virusa BKK i da je ovaj protokol specifičan samo za detekciju vakcinalnih sojeva virusa.

Protokolom Vakcinalni Niš ispitano je 220 uzoraka (105 uzoraka poreklom od 68 sumnjivih goveda pre vakcinacije, 40 uzoraka koji potiču od sumnjivih životinja nakon vakcinacije, 40 uzoraka poreklom od deset vakcinisanih teladi i 35 sigurno negativnih uzoraka na virus BKK). Utvrđeno je da su svi uzorci poreklom od životinja pre vakcinacije bili negativni. Ispitivanjem 40 uzoraka od 20 vakcinisanih goveda genom vakcinalnog soja virusa BKK detektovan je u 10% (4/40), kao i u tri (7,5%) uzorka poreklom od 10 teladi koja su vakcinisana 2019. godine. Upoređivanjem rezultata dobijenih ispitivanjem istih uzoraka nested PCR metodom (Menasherow i sar., 2014), protokolom KV-vac, Vakcinalni Niš i komercijalnim real-time PCR testom ustanovljena je idealna usaglašenost ($k=1$) svih navedenih testova u detekciji vakcinalnog soja virusa. Iako postoje studije kojima je dokazana veća osetljivost real-time PCR protokola u odnosu na nested PCR protokol (Vidanović i sar., 2016; Stubbs i sar., 2012), rezultati uporednog ispitivanja uzoraka na prisustvo genoma vakcinalnog soja virusa BKK protokolom Vakcinalni Niš i nested PCR testom nisu pokazali razlike u osetljivosti između ova dva protokola. Na osnovu sprovedenog ispitivanja utvrđeno je da se pripremljen i standardizovan real-time PCR protokol Vakcinalni Niš može koristiti u cilju sigurne diferencijacije inficiranih od vakcinisanih životinja. Ovaj protokol ima prednosti u odnosu na nested PCR zbog jednostavnosti u izvođenju i brzine dobijanja rezultata. Prednost protokola Vakcinalni Niš u odnosu na komercijalni real-time PCR test je pored cene i taj što komercijalni real-time PCR test ne detektuje specifično vakcinalni soj virusa BKK, već se interpretacija rezultata tumači preko Ct vrednosti dobijene za dva ciljna regiona - ciljni region koji je zajednički za vakcinalni i terenski soj virusa i ciljni region za terenski soj, što komplikuje interpretaciju rezultata.

Nesumnjivo, odluka o primeni protokola za dijagnostiku BKK (protokol specifičan za CaPV, specifičan za terenski i/ili vakcinalni soj virusa BKK) trebala bi se zasnivati na epizootiološkom statusu u državi (da li se BKK javlja enzootski ili je država slobodna od BKK, da li su prisutne SPPV i GTPV) i vrsti primenjene vakcine protiv BKK. U slučaju pojave BKK i potrebe za ispitivanjem velikog broja uzoraka preporuka je da se koristi protokol prema Bowden i sar. (2008) kojim se detektuju svi CaPV, a koji je osetljiviji u odnosu na protokole za terenske sojeve (KV-2, Terenski Niš), a samo pozitivni uzorci bi se ispitivali protokolima specifičnim za terenske odnosno vakcinalne sojeve virusa. Za razlikovanje terenskog od vakcinalnog soja virusa prednost imaju real-time PCR protokoli u odnosu na nested PCR Menasherow i sar. (2014) jer imaju veću osetljivost, jednostavniji su za izvođenje i brži (za izvođenje real-time PCR protokola potrebno je oko 1,5h, a za izvođenje nested PCR protokola sa restrikcionim enzimom potrebno je 7-8h).

Epizootiološka analiza epizootije BKK obuhvatila je utvrđivanje broja žarišta, brzine širenja epizootije, analizu prostorne i vremenske distribucije epizootije BKK, mapiranje epizootije i ispitivanje učestalosti kliničkih simptoma kod goveda posle vakcinacije na epizootiološkom području VSI Niš.

Poznavajući epizootiološke karakteristike i dosadašnje obrasce širenja bolesti u zemljama jugoistočne Evrope, pojava BKK u R. Srbiji bila je očekivana. Imajući u vidu mogućnosti prenošenja virusa BKK vektorima i neovlašćenim kretanjem životinja, čak i kratko prisustvo zaraženih životinja predstavljalo je značajan rizik za širenje zaraze u prijemljivoj populaciji životinja (EFSA, 2017). U trenutku pojave prvih žarišta na teritoriji R. Srbije najbliža žarišta BKK u susjednim zemljama (Bugarska i Severna Makedonija) nalazila u pograničnom području na udaljenosti od 25 do 30 km (Manić i sar., 2019).

Ne postoje dokazi o načinu prenosa bolesti na područje R. Srbije, ali se može pretpostaviti da su insekti preneti vetrom ili uneti prevoznim sredstvima iz susjednih zemalja odgovorni za prenošenje virusa BKK. Period godine u kojem je došlo do epizootije BKK, prosečne mesečne temperature vazduha, gustina naseljenosti goveda u istraživanom području, izračunate prosečne prostorne i vremenske udaljenosti između najbližih žarišta (4,32 km/9 dana), ukazuju na značaj hematofagnih insekata u transmisiji BKK na teritoriju R. Srbije (Manić i sar., 2019). Ova pretpostavka u skladu je sa rezultatima prostorne i vremenske distribucije epizootije BKK na

Balkanu koja je pokazala da je širenje bolesti na manje udaljenosti (<10–15 km/nedeljno) povezano sa prenosom virusa BKK inficiranim vektorima, ali i kontaktima između inficiranih i prijemljivih goveda (Mercier i sar., 2018). Nije utvrđeno da li je u pograničnim područjima bilo slučajeva ilegalnog transporta ili prodaje životinja.

Tokom epizootije BKK u R. Srbiji je registrovano 225 žarišta, od toga na ispitivanom području 189, odnosno 84% od ukupnog broja žarišta. Na epizootiološkom području VSI Niš koji obuhvata pet okruga, epizootija BKK je registrovana u četiri okruga (Pčinjski, Pirotski, Jablanički i Toplički okrug). Najveći broj žarišta je registrovan u Pčinjskom okrugu (75,1% svih žarišta u Srbiji). U Pirotskom okrugu registrovano je 11 žarišta (4,9%), u Jablaničkom 7 (3,1%) i u Topličkom okrugu dva žarišta (0,9%) koja su se pojavila nakon završene vakcinacije. Bolest nije registrovana jedino u Nišavskom okrugu. Razlog zašto se epizootija nije proširila na Nišavski okrug je nepoznat. Mogući razlog je što se Nišavski okrug nalazi najudaljenije od granica sa susednim zemljama, tako da je bilo dovoljno vremena da se epizootija zaustavi vakcinacijom životinja (Manić i sar., 2019). Epizootija BKK je registrovana uglavnom u područjima koja se graniče sa Bugarskom, Severnom Makedonijom, administrativnom granicom sa Kosovom i sa Crnom Gorom (Manić i sar., 2019).

Od pojave prvog slučaja BKK u Pčinjskom okrugu, epizootija se tokom juna i jula meseca proširila na jugozapadni i istočni deo R. Srbije i registrovana je u ukupno 11 okruga. Tokom juna meseca pored širenja epizootije na području Pčinjskog, Pirotskog i Jablaničkog okruga registrovano je jedno žarište na udaljenosti od preko 100 km severno (Zaječarski okrug). U julu mesecu pojavila su se još dva žarišta na udaljenosti preko 100 km, u Borskom i Braničevskom okrugu. Prema zvaničnim izveštajima, prenos bolesti na ova područja dovodi se u vezu sa ilegalnim transportom životinja, a što je u skladu sa analizama da je za prenošenje bolesti na veće udaljenosti neophodno kretanje zaraženih životinja (EFSA, 2017; Mercier i sar., 2018). Tokom epizootije 2016. godine u Ruskoj Federaciji pojedini slučajevi BKK bili su udaljeni 800 do 1000 km od pretpostavljenog epizootiološkog centra, pa se smatra da je širenje bolesti u ove krajeve nastalo nelegalnim kretanjem i/ili trgovinom zaraženih životinja (Sprygin i sar., 2018a). Broj registrovanih žarišta BKK u R. Srbiji tokom jula meseca (125 žarišta u celoj zemlji, od toga 101 žarište na ispitivanom području) nije bio statistički značajno veći nego u junu mesecu (χ^2 test 4,92; $p < 0,05$), čemu su delom doprineli i klimatski uslovi koji su pogodovali aktivnostima insekata (prosečna temperatura vazduha tokom jula meseca je iznosila 22°C). Nagli pad broja žarišta tokom avgusta, septembra i oktobra meseca bio je povezan sa primenjenim merama kontrole i suzbijanja BKK, a najvećim delom sa sprovođenjem vakcinacije. Međutim, i vremenski uslovi, odnosno pad temperature vazduha u septembru i oktobru uticao je na smanjenje aktivnosti vektora. Širenju epizootije doprinela je i činjenica da se u južnim delovima R. Srbije, kao i zemljama u okruženju (Grčka, Bugarska i Severna Makedonija) (Tuppurainen i sar., 2019) životinje od aprila do oktobra drže na otvorenom ili se premeštaju na zajedničke pašnjake što omogućava kontakt životinja sa različitim vrstama hematofagnih insekata - potencijalnih vektora, kao i direktni kontakt životinja iz različitih stada.

Utvrđivanje značaja pojedinih hematofagnih insekata kao potencijalnih vektora virusa BKK predmet je brojnih istraživanja. Iako je do sada utvrđen vektorski potencijal roda *Muscidae* (*Stomoxys calcitrans* i *Biomya fasciata*) (Weiss, 1968; Mellor i sar., 1987), komaraca vrste *Aedes aegypti* (Chihota i sar., 2001) i krpelja vrste *Rhipicephalus appendiculatus* i *Ambliomma hebraeum* (Tuppurainen i sar., 2013; Tuppurainen i sar., 2015a; Tuppurainen i sar., 2015b; Lubinga i sar., 2015) ne treba zanemariti i ulogu drugih hematofagnih insekata (*Culicoides*, *Culicidae*, *Tabanidae* sp.) (EFSA, 2017). Imajući u vidu da se od potvrđenih vektora virusa BKK u Srbiji pojavljuje samo *S. calcitrans*, može se pretpostaviti da su ova vrsta i ostale vrste roda *Muscidae* imale ulogu u prenošenju virusa BKK. Na području R. Srbije u uzorcima *S. calcitrans* koji su sakupljeni iz okruženja vakcinisanih životinja nije utvrđeno prisustvo genoma virusa BKK (Milovanović, 2019).

Na epizootiološkom području VSI Niš žarišta BKK su registrovana na nadmorskoj visini od 260 do 1495 m, pri čemu je 90% žarišta registrovano na nadmorskoj visini preko 500 m (prosečno 992 m) (Manić i sar., 2019). Pojava žarišta na većim nadmorskim visinama može se objasniti činjenicom da se bolest pojavila u periodu kada se većina goveda napasa na planinskim pašnjacima. Generalno, žarišta BKK se mogu pojaviti na područjima sa različitim nadmorskim visinama. Tako su tokom epizootije 2016. godine žarišta BKK registrovana u 16 regiona u Ruskoj Federaciji, pri čemu nije utvrđena razlika u broju žarišta u odnosu na nadmorsku visinu (Sprygin i sar., 2018a). U susjednoj Crnoj Gori je oko 80% žarišta registrovano na nadmorskoj visini od 1600 m i više, što je povezano sa geografskim karakteristikama i tradicionalnim načinom ispaše stoke na planinskim pašnjacima u ovoj državi (EFSA, 2017).

Na epizootiološkom području VSI Niš epizootija BKK je trajala do 10. avgusta 2016. godine. Na području deset okruga epizootija je trajala oko dva meseca, izuzev u Raškom okrugu u kome je trajala približno tri meseca (do 1. oktobra 2016. godine). Razlog za navedenu epizootiološku situaciju u Raškom okrugu može se objasniti činjenicom da se u pojedinim opštinama ovog okruga vakcinacija goveda sprovodila sporije, što se može dovesti u vezu sa nomadskim načinom stočarenja i ispašom stoke na nepristupačnim terenima što je otežavalo sprovođenje vakcinacije (Manić i sar., 2019). U zemljama u regionu epizootija BKK najkraće je trajala u Crnoj Gori (1 mesec), zatim u Bugarskoj (3,5 meseci), Severnoj Makedoniji skoro šest meseci, dok se u Grčkoj epizootija javila u dva talasa i trajala je 15 meseci (tokom perioda 2015-2016. godine). Tokom 2017. godine u Grčkoj su registrovana samo dva žarišta, u Severnoj Makedoniji četiri žarišta, dok je u Albaniji registrovano 379 žarišta (Tuppurainen i sar., 2019). Tokom 2018. i 2019. godine u regionu Balkana nisu registrovana nova žarišta BKK (EFSA, 2019; EFSA, 2020).

Prema izveštajima iz zemalja u kojima se BKK pojavila u poslednjih nekoliko godina (zemlje jugoistočne Evrope, Bliskog Istoka, Ruska Federacija i Azerbejdžan) uočava se da su brzina širenja epizootije, kao i stope morbiditeta, mortaliteta i letaliteta zavisile od geografskog područja, aktivnosti i brojnosti vektora, načina uzgoja stoke, rase goveda, imunskog statusa životinja i brzine sprovođenja mera kontrole bolesti (Sameea Yousefi i sar., 2017; Zeynalova i sar., 2016; Kasem i sar., 2016; Sprygin i sar., 2018a). U enzootskim područjima BKK stope morbiditeta se kreću od 5 do 45% (Coetzer, 2018), dok u područjima gde se bolest nije ranije javljala stopa morbiditeta može ići i do 100% (Coetzer, 2004). Mortalitet je relativno nizak i kreće se od 1 do 3% izuzetno do 10% (Coetzer, 2018), odnosno 40% (Davies, 1991a). Analizom podataka sa ispitivanog područja stopa morbiditeta kretala se od 4,1% (Pirotski okrug) do 16,9% (Pčinjski okrug). Prosečna stopa morbiditeta na epizootiološkom području VSI Niš (13,6%), bila je približna prosečnoj stopi morbiditeta na teritoriji cele R. Srbije (13,3%). Najniža stopa morbiditeta u R. Srbiji zabeležena je u Zaječarskom okrugu (0,38%), a najviša na području Raškog (23,1%) i Moravičkog okruga (33,3%) (Manić i sar., 2019). Prosečna stopa morbiditeta u Srbiji bila je slična stopi morbiditeta u drugim zemljama jugoistočne Evrope, Severnoj Makedoniji (14,5%), Bugarskoj (13%), Crnoj Gori (20%), Turskoj 12,3% i Grčkoj (7%). Izuzetak je Albanija gde je utvrđena značajno viša stopa morbiditeta (42%) (Sevik i Dogan, 2017; Tuppurainen i sar., 2019). U Ruskoj Federaciji morbiditet se kretao od 0,5 do 100%, prosečno 10% (Sprygin i sar., 2018a).

U R. Srbiji prosečna stopa mortaliteta je iznosila 2,1% (Tuppurainen i sar., 2019), a na epizootiološkom području VSI Niš 0,4%, pri čemu je mortalitet registrovan samo u Pčinjskom (0,5%) i Jablaničkom (1,6%) okrugu (Manić i sar., 2019). U zemljama u okruženju stopa mortaliteta se kretala od 0,5% u Crnoj Gori, 1% u Bugarskoj, 1,5% u Grčkoj, 6,4% u Turskoj i 12% u Albaniji, dok u Severnoj Makedoniji mortalitet nije zabeležen (0%) (Sevik i Dogan, 2017; Tuppurainen i sar., 2019). Prosečna stopa letaliteta na epizootiološkom području VSI Niš iznosila je 3,25%.

Na epizootiološkom području VSI Niš, na kome su mlečne krave najzastupljenija kategorija (64,15%) u odnosu na priplodne bikove i bikove za tov (8,90%), junice (2,66%) i telad (24,29%)

najviša stopa morbiditeta od 94,55%, registrovana je u kategoriji mlečnih krava, a najniža kod teladi (2,73%) (χ^2 test 39,88; $p \leq 0,01$). Nizak morbiditet kod teladi može se dovesti u vezu sa činjenicom da se telad ređe drži na otvorenom prostoru i paši, čime se smanjuje mogućnost kontakta sa vektorima ili inficiranim životinjama iz drugih stada (Manić i sar., 2019). Stopa mortaliteta u kategoriji teladi (0,51%) je bila približna stopi mortaliteta kod mlečnih krava (0,48%), dok je letalitet kod teladi bio znatno veći (33,3%) nego kod krava (2,4%), što ukazuje na činjenicu da su telad oboljevala sa težim kliničkim simptomima i da se bolest kod teladi u trećini slučajeva završavala uginućem, što potvrđuju i druge studije (Gari i sar., 2011).

U odnosu na starosne kategorije, utvrđeno je da je najveći broj obolelih životinja bio stariji od 5 godina (57,3%), u odnosu na kategorije starosti između 2 i 5 godina (20,5%) i mlađih od 2 godine (22,3%) (χ^2 test 56,85; $p \leq 0,01$) (Manić i sar., 2019). Veća stopa morbiditeta kod goveda starijih od dve godine zabeležena je u Saudijskoj Arabiji (Kasem i sar., 2018), u Etiopiji je utvrđena veća osetljivost mlađih kategorija (Gari i sar., 2011), dok u Egiptu nije utvrđena statistički značajna povezanost između uzrasta i stope prevalencija, ukazujući da su različite starosne kategorije podjednako izložene riziku (Elhaig i sar., 2017). Na ispitivanom području stopa mortaliteta u kategoriji teladi i krava je bila približno ista, međutim, letalitet je bio znatno veći u kategoriji životinja mlađih od 2 godine.

Stope morbiditeta, mortaliteta i letaliteta u R. Srbiji, kao i zemljama jugoistočne Evrope ne pokazuje realno stanje imajući u vidu ranu primenu vakcinacije, kao i sprovođenje drugih mera kontrole i suzbijanja bolesti.

Imajući u vidu širenje epizootije BKK u regionu u cilju kontrole bolesti na području R. Srbije sprovedena je vakcinacija homolognom atenuiranom vakcinom pripremljenom od *Neethling* soja virusa BKK (*Lumpy skin Disease vaccine for Cattle*, OBP, South Africa). Na epizootiološkom području VSI Niš vakcinacija celokupne populacije goveda (100%) je završena za mesec dana, dok je na teritoriji cele R. Srbije vakcinacija 99,7% populacije goveda završena za dva meseca (do 31.08.2016.). U susednim državama, Bugarskoj i Crnoj Gori, vakcinacija je završena u avgustu 2016. godine, u Severnoj Makedoniji do kraja decembra 2016. godine, dok je u Grčkoj i Albaniji vakcinacija nastavljena i u 2017. godini. Osim država u kojima se BKK pojavila, R. Hrvatska i Bosna i Hercegovina su jedine zemlje u kojima je 2016., odnosno 2017. godine vakcinacija uvedena kao mera kontrole, a da na svojoj teritoriji nisu imale registrovane slučajeve bolesti (EFSA, 2017; EFSA, 2018a). Nakon završetka vakcinacije celokupne populacije goveda, u periodu od mesec dana nisu se pojavljivala nova žarišta BKK u R. Srbiji, Bugarskoj i Crnoj Gori, što je pokazalo na izuzetan značaj vakcinacije kao mere u kontroli bolesti (Tuppurainen i sar., 2019).

Izveštaji iz zemalja u kojima su goveda vakcinisana živom atenuiranom vakcinom protiv BKK ukazuju na to da su se kod izvesnog procenta životinja nakon aplikacije vakcine razvile određene kliničke promene koje su se ispoljavale od blagih sistemskih reakcija do pojave karakterističnih kliničkih promena sa pojavom čvorova na koži, padom mlečnosti, smanjenjem apetita, porastom telesne temperature, pobačaja i dr. (Abutarbush i sar., 2016; Katsoulos i sar., 2017; Bedeković i sar., 2018). Na epizootiološkom području VSI Niš postvakcinalne komplikacija nisu sistemski praćene, ali su prijavljene 124 životinje sa simptomima koji su se pojavili u periodu od jednog do 30 dana nakon vakcinacije. Pregledom uzoraka od 20 goveda primenom real-time PCR protokola, kao i nested PCR protokolom kod svih životinja utvrđeno je prisustvo terenskog soja ili je postojala koinfekcija terenskog i vakcinalnog soja ukazujući da se radilo o životinjama koje su vakcinisane u periodu inkubacije. Dobijeni rezultati ukazuju da primena atenuirane vakcine koja sadrži *Neethling* soj virusa BKK nije dovođila do postvakcinalnih reakcija (Manić i sar., 2019). Međutim, u Hrvatskoj, u kojoj nije bilo slučajeva BKK kod goveda su registrovane promene nakon vakcinacije (pojava čvorova na koži, pad mlečnosti i dr.). Nakon izolacije i sekvenciranja genoma vakcinalnog soja (*Neethling* soja virusa BKK) virusa BKK utvrđeno je da je genom vakcinalnog soja virusa nakon pasaže kroz organizam goveda ostao nepromenjen (Lojkić i sar., 2018), što ukazuje da je upotreba žive vakcine bezbedna i da je malo verovatno da

će vakcinalni soj povratiti virulenciju nakon vakcinacije životinja (Tuppurainen i sar., 2019). Na području Balkana (osim u Hrvatskoj), istovremeno trajanje epizootije i sprovođenje vakcinacije goveda protiv BKK, bili su razlog za teškoće u proceni da li su klinički znaci prisutni kod vakcinisanih životinja prouzrokovani vakcinalnim sojem, terenskim sojem ili sa oba soja istovremeno.

Na početku epizootije u R. Srbiji primenjivan je kompletan *stamping out*, odnosno eutanazija svih goveda u stadu/žarištu u kome je potvrđen bar jedan klinički slučaj bolesti. Nakon početka vakcinacije, u žarištima gde su registrovani klinički slučajevi BKK, eutanazirana su samo goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima. Tokom trajanja epizootije BKK u R. Srbiji ukupno je eutanazirano 709 (0,075%) goveda (547 pre i 142 tokom vakcinacije) u odnosu na ukupnu populaciju goveda u R. Srbiji, dok je na epizootiološkom području VSI Niš eutanazirano 603 životinja (479 pre i 124 tokom vakcinacije) što je čak 85% u odnosu na ukupan broj eutanaziranih životinja u R. Srbiji (Manić i sar., 2019). Imajući u vidu gore navedeno, pored sprečavanja širenja bolesti, prednost uvođenja vakcinacije se ogledao i u smanjenju ekonomskih gubitaka s obzirom da je broj eutanaziranih životinja nakon vakcinacije bio znatno manji od broja eutanaziranih životinja pre vakcinacije (χ^2 test 244,71, $p \leq 0,001$). U R. Srbiji broj eutanaziranih goveda bio je značajno manji u odnosu na Severnu Makedoniju (3454; 1,54%), Grčku (6080; 0,83), Crnu Goru (561; 0,59%) i Bugarsku (2814; 0,40%). Ove razlike se mogu dovesti u vezu sa činjenicom da su Grčka i Bugarska sprovodile potpuni *stamping out* u svim žarištima bez obzira na vakcinaciju, dok se na području Severne Makedonije i Grčke vakcinacija sprovodila sporije (EFSA, 2017).

Analizom vremena koje je proteklo od postavljanja sumnje do suzbijanja BKK u žarištima na epizootiološkom području VSI Niš, utvrđeno je da je prosečno vreme iznosilo 2,2 dana, a u 46,6% žarišta 24h, što ukazuje na izuzetno brzo reagovanje veterinarske službe (Manić i sar., 2019). Analizirajući epizootiju BKK u R. Srbije može se zaključiti da je veterinarska služba pokazala izuzetnu spremnost i efikasnost u suzbijanju BKK, što je imalo veliki značaj u sprečavanju daljeg širenja bolesti i dodatnih ekonomskih gubitaka kako na području R. Srbije tako i zemljama u okruženju (Hrvatska i Bosna i Hercegovina). Na području R. Srbije od 2016. godine kada je sprovedena vakcinacija cele populacije goveda protiv BKK, svake godine se radi revakcinacija, kao i redovna vakcinacija novorođenih životinja (Manić i sar., 2019).

7. ZAKLJUČCI

1. Metodom izolacije virusa na kulturi ćelija virus bolesti kvrgave kože goveda je izolovan posle druge pasaže iz uzorka bioptata kože, a prisustvo virusa je potvrđeno primenom klasičnih (VNT) i molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike (real-time PCR). Izolovani soj - *Pčinj 1* je drugi izolat virusa bolesti kvrgave kože goveda sa područja Republike Srbije.
2. Filogenetskom analizom uz primenu *Neighbor-Joining* metode ustanovljeno je da su nukleotidne sekvence dela RPO30, GPCR, EEV i P32 gena virusa *Pčinj 1* i šest ekstrahovanih nukleinskih kiselina virusa iz bioptata kože goveda bile 100% identične sa analognim sekvencama soja virusa *Serbia/Bujanovac/2016* i analognim sekvencama terenskih sojeva virusa bolesti kvrgave kože goveda poreklom iz Grčke, Izraela, Ruske Federacije i Južne Afrike.
3. Analizom filogenetskog stabla formiranog na osnovu poređenja celih genoma kapripoksvirusa (CaPV) koji se nalaze u međunarodnoj banci gena (*GeneBank*) utvrđeno je da se virus izolovan u Republici Srbiji (*Serbia/Bujanovac/2016*) nalazi u podklasteru sa terenskim sojevima virusa bolesti kvrgave kože goveda izolovanih iz različitih delova sveta. Najveća podudarnost u redosledu nukleotida utvrđena je sa sojevima virusa poreklom iz Grčke (*Evos/GR/15*) 99,99%, Izraela (*155920/2012*) 99,98%, Ruske Federacije (*Dagestan/2015*) 99,96% i Južne Afrike (*Neethling Warmbaths LW*) 99,95%. Manji stepen podudarnosti utvrđen je sa vakcinalnim sojevima virusa bolesti kvrgave kože *Neethling-LSD vaccine-OBP* (98,88%), *SIS-Lumpyvax vaccine* i *Neethling-Herbivac vaccine* (98,87%) i sojem izolovanim u Ruskoj Federaciji (*LSDV/Russia/Saratov/2017*) 99,07%.
4. Prisustvo virusa bolesti kvrgave kože utvrđeno je u 87,8% uzoraka bioptata kože, 72,7% uzoraka krvi i 62,5% uzoraka nosnih briseva goveda sa ispoljenim kliničkim simptomima bolesti. Nalaz visokog procenta pozitivnih uzoraka krvi i nosnih briseva pokazali su da su uzorci uzimani u ranoj fazi infekcije. Na osnovu dobijenih rezultata preporučuje se da se u cilju sigurne dijagnoze bolesti kvrgave kože goveda od iste životinje ispituju različite vrste uzoraka.
5. Poređenjem rezultata ispitivanja dobijenih primenom protokola za izvođenje metode real-time PCR, Bowden i sar. (2008) i KV-2 na osnovu dobijene vrednosti $k=0,850$ utvrđen je idealni nivo saglasnosti između ova dva protokola koja su se koristila u dijagnostici bolesti kvrgave kože goveda na teritoriji Republike Srbije.
6. Poređenjem sa real-time PCR protokolom Bowden i sar. (2008) specifičnost nested PCR protokola iznosila je 100%, a osetljivost 91,37%. Saglasnost između ova dva protokola iznosila je 0,467 što je u rangu prilične podudarnosti. U odnosu na real-time PCR protokol KV-2 specifičnost nested PCR protokola iznosila je 100%, a osetljivost 92,70%, dok je utvrđena saglasnost između ova dva protokola iznosila 0,584 što je u rangu prilične podudarnosti. Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata utvrđeno je da prednost u dijagnostici imaju protokoli za izvođenje real-time PCR metode u odnosu na nested PCR zbog veće osetljivosti, ali i bržeg i jednostavnijeg izvođenja.
7. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je novi protokol za izvođenje real-time PCR metode pod nazivom Terenski Niš specifičan u identifikaciji svih kapripoksvirusa. U odnosu na real-time PCR protokol Bowden i sar. (2008), novim protokolom mogu se razlikovati terenski od vakcinalnih sojeva virusa bolesti kvrgave kože. Poređenjem sa protokolom Bowden i sar. (2008) specifičnost protokola Terenski Niš iznosila je 100%, a osetljivost 99,28%, dok je u odnosu na protokol KV-2 utvrđena specifičnost 87,50% i osetljivost 100%. Utvrđena je potpuna saglasnost protokola Terenski Niš sa

komercijalnim real-time PCR testom ($k=1$), idealna saglasnost sa protokolom KV-2 ($k=0,930$) i protokolom Bowden i sar. (2008) ($k=0,919$) i prilična saglasnost sa nested PCR protokolom ($k=0,527$). Dobijeni rezultati pokazali su da je protokol Terenski Niš pouzdan test koji se može koristiti u dijagnostici bolesti kvrgave kože goveda u enzootskim područjima gde nisu prisutne boginja i koza.

8. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je novi protokol za izvođenje real-time PCR metode pod nazivom Vakcinalni Niš specifičan u identifikaciji vakcinalnih sojeva virusa bolesti kvrgave kože goveda. Kappa statističkom analizom utvrđena je potpuna saglasnost ($k=1$) između real-time PCR protokola Vakcinalni Niš, KV-vac, komercijalnog real-time PCR testa i nested PCR.
9. Na epizootiološkom području VSI Niš tokom trajanja epizootije ukupno je registrovano 189 žarišta bolesti kvrgave kože goveda od kojih 90 pre i 99 žarišta tokom kampanje vakcinacije. Najveći broj žarišta registrovan je u Pčinjskom okrugu (169), u odnosu na Pirotski (11), Jablanički (7) i Toplički okrug (2). Nije utvrđen uticaj nadmorske visine na širenje epizootije imajuću u vidu da su žarišta registrovana na područjima sa nadmorskom visinom od 260 do 1495 m, pri čemu je više od 50% žarišta registrovano na nadmorskoj visini od 782 do 1234 m, prosečno 992 m. Bolest kvrgave kože češće je registrovana u žarištima sa prosečnim brojem goveda od 3 do 10 (50%) u odnosu na žarišta sa manje od 3 (28,6%) i više od 10 životinja (21,4%).
10. Mapiranjem svih žarišta i primenom prostorno vremenske analize utvrđeno je da se epizootija bolesti kvrgave kože goveda na epizootiološkom području VSI Niš širila prosečnom brzinom od 4,3km/9 dana. Uzimajući u obzir prostornu i vremensku udaljenost najbližih žarišta u susednim zemljama, nadmorsku visinu u pograničnom području, kao i brzinu širenja epizootije može se pretpostaviti da su hematofagni insekti imali ključnu ulogu u prenošenju virusa bolesti kvrgave kože goveda na teritoriju Republike Srbije, kao i u lokalnom širenju virusa na ispitivanom području.
11. Utvrđena prosečna stopa morbiditeta na nivou stada iznosila je 13,6%, mortaliteta 0,4% i letaliteta 3,25%. Stopa morbiditeta je bila značajno veća u kategoriji mlečnih krava (94,55%), u odnosu na telad (2,73%), junice (1,82%) i priplodne i tovne bikove (0,90%). Letalitet je utvrđen samo kod teladi (33,3%) i mlečnih krava (2,4%). Najveća prevalencija je utvrđena kod goveda starijih od 5 godina (57,3%), u odnosu na goveda starosti od 2 do 5 godina (20,5%) i mlađih od 2 godine (22,3%).
12. Na epizootiološkom području VSI Niš klinički simptomi registrovani su, u periodu od 1 do 30 (prosečno 8,7) dana nakon vakcinacije, kod 0,13% od ukupnog broja vakcinisanih goveda. Ispitivanjem uzoraka vakcinisanih goveda u 97,5% uzoraka utvrđen je samo terenski, a u 10% uzoraka i terenski i vakcinalni soj virusa. Na osnovu činjenice da je terenski soj virusa detektovan kod svih vakcinisanih goveda potvrđeno je da su kliničke promene posledica infekcije virusom bolesti kvrgave kože.
13. Dobijeni rezultati ukazuju da je u područjima u kojima se sprovodi vakcinacija goveda protiv bolesti kvrgave kože neophodna primena pouzdanih testova kojima je moguće razlikovati terenske i vakcinalne sojeve virusa u ispitujućim uzorcima. Na ovaj način se jedino sigurno može utvrditi prisustvo inficiranih životinja i isključiti moguće postvakcinalne komplikacije.
14. Sprovedena ispitivanja i dobijeni rezultati potvrdili su opravdanost primene molekularnih metoda, kako u brzom i pouzdanoj dijagnostici bolesti kvrgave kože goveda, tako i u proceni epizootiološke situacije.

8. LITERATURA

1. Abdelwahab M. G., Khafagy H. A., Moustafa A. M., Saad M. A., (2016). Evaluation of humoral and cell-mediated immunity of lumpy skin disease vaccine prepared from local strain in calves and its related to maternal immunity. *Journal of American Science*, 12:38–45
2. Abera Z., Degefu H., Gari G., Kidane M., (2015). Sero-prevalence of lumpy skin disease in selected districts of west Wollega zone. *BMC Vet Res* 2015:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0432-7>
3. Abutarbush S.M., Hananeh W.M., Ramadan W., Al Sheyab O.M., Alnajjar A.R., Al Zoubi I.G., Knowles N.J., Bachanek-Bankowska K., Tuppurainen E.S.M., (2016). Adverse Reactions to Field Vaccination Against Lumpy Skin Disease in Jordan, *Transboundary Emerging Diseases*, 63 (2), pages 213-219. doi: 10.1111/tbed.12257
4. Adedeji A.J., Möller J., Meseko C.A., Adole J.A., Tekki I.S., Shamaki D., Hoffmann B., (2019). Molecular characterization of *Capripox* viruses obtained from field outbreaks in Nigeria between 2000 and 2016, *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (4), pages 1631-1641 <https://doi.org/10.1111/tbed.13197>
5. Agianniotaki E.I., Chaintoutis S.C., Haegeman A., Tasioudi K.E., De Leeuw I., Katsoulos P.D., Sachpatzidis A., De Clercq K., Alexandropoulos T., Polizopoulou Z. S., Chondrokouki E., Dovas C.I., (2017c). Development and validation of a TaqMan probe-based real-time PCR method for the differentiation of wild type lumpy skin disease virus from vaccine virus strains, *Journal of Virological Methods* 249 (2017) 48–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.011>
6. Agianniotaki E.I., Mathijs E., Vandenbussche F., Tasioudi K.E., Haegeman A., Iliadou P., Chaintoutis S.C., Dovas C.I., Van Borm S., Chondrokouki E.D., De Clercq K., (2017a). Complete genome sequence of the lumpy skin disease virus isolated from the first reported case in Greece in 2015. *Genome Announc.* 5:e00550-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00550-17>
7. Agianniotaki E.I., Tasioudi K.E., Chaintoutis S.C., Iliadou P., Mangana-Vougiouka O., Kirtzalidou A., Alexandropoulos T., Sachpatzidis A., Plevraki E., Dovas C.I., Chondrokouki E. (2017b). Lumpy skin disease outbreaks in Greece during 2015-16, implementation of emergency immunization and genetic differentiation between field isolates and vaccine virus strains, *Vet. Microbiol.*, 201:78-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.037
8. Ali A.A., Esmat M., Attia H., Selim A., Abdelhamid Y.M., (1990). Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt. *Vet. Rec.*, 127, 549-550.
9. Annandale C.H., Holm D.E., Ebersohn K., Venter E.H., (2014). Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. *Transbound. Emerg. Dis.*, 61, 443-448.
10. Annandale C.H., Irons P.C., Bagla V.P., Osuagwuh U.I., Venter E.H., (2010). Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 250-255.
11. Antoniou S.-E., Tsiamadis E., Tasioudi K.E., Moraitis S., Plevraki E., Sachpatzidis A., Perdikaris S., Vitalis T., Arakas N., Lianou D., Chondrokouki E., Malemis I., Alexandropoulos T., Dile C., (2017). Lumpy Skin Disease in Greece: An European approach of the management of the Disease, in *FAO EMPRES-Animal Health 360: Special edition on Lumpy Skin Disease No. 47*. pp. 19–22.
12. Ayelet G., Abate Y., Sisay T., Nigussie H., Gelaye E., Jemberie S., Asmare K., (2013). Lumpy skin disease: preliminary vaccine efficacy assessment and overview on outbreak impact in dairy cattle at Debre Zeit, central Ethiopia. *Antiviral Res.* 98, 261–265.

13. Babiuk S., (2018a). Diagnostic Tools. In: Lumpy Skin Disease. Springer International Publisher AG part of Springer Nature. Cham, Switzerland, pp 73-79.
14. Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B., Wallace D.B., Kitching R.P., (2008b). *Capripoxviruses*: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 55, 263–272.
15. Babiuk S., Bowden T.R., Parkyn G., Dalman B., Manning L., Neufeld J., Embury-Hyatt C., Copps J., Boyle D.B., (2008a). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.*, 55, 299-307.
16. Babiuk S., Wallace D.B., Smith S.J., Bowden T.R., Dalman B., Parkyn G., Copps J., Boyle D.B., (2009). Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transbound. Emerg. Dis.* 56, 132-141.
17. Babiuk S. (2018b). Immunity. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 65-69). Springer, Cham.
18. Balinsky C.A., Delhon G., Smoliga G., Prarat M., French R.A., Geary S.J., Rock D. L., Rodriguez L.L., (2008). Rapid preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2):438-442. doi: 10.1128/JCM.01953-07
19. Barnard B., Munz E., Dumbell K., Prozesky L., (1994). Lumpy skin disease. In: Coetzer, J.A.W., Thomson G.R. and Tustin R.C.: *Infectious diseases of livestock: with special reference to Southern Africa Vol 1*. Oxford University Press, Cape Town, 604-612.
20. Barnard B.J., (1997). Antibodies against some viruses of domestic animals in southern African wild animals. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 64, 95-110.
21. Beard P.M., (2016). Lumpy skin disease: a direct threat to Europe. *Vet. Rec.*, 178 (22), 557-558.
22. Bedeković T., Šimić I., Krešić N., Lojkić I., (2018). Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (2):491-496. doi: 10.1111/tbed.12730
23. Ben-Gera J., Klement E., Khinich E., Stram Y., Shpigel N.Y., (2015). Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease – The results of a randomized controlled field study. *Vaccine* 33, Pages 4837-4842.
24. Binopal Y.S., Ongadi F.A., Chepkwony J.C., (2001). Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68: 151–153.
25. Bowden T.R., Babiuk S.L., Parkyn G.R., Coops J.S., Boyle D.B., (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371 (2), 380-93. doi: 10.1016/j.virol.2007.10.002
26. Bowden T.R., Coupar B.E., Babiuk S.L., White J.R., Boyd V., Duch C.J., Shiell B. J., Ueda N., Parkyn G.R., Copps J.S., Boyle D.B. (2009). Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 161:19–29.
27. Božičić-Lothrop B, Vujić A., (1996). Fauna of mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) of Stara Planina, Serbia. *Acta Entomol Serbica* 2: 31-38.
28. Brenner J., Bellaiche M., Gross E., Elad D., Oved Z., Haimovitz M., Wasserman A., Friedgut O., Stram Y., Bumbarov V., Yadin H. (2009). Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease: statutory challenge. *Vacc.* 27, 1500-1503.

29. Brenner J., Haimovitz M., Oron E., Stram Y., Fridgut O., Bumbarov V. Kuznetzova L., Oved Z., Wasserman A., Garazzi S., Perl S., Lahav D., Edery N. and Yadin H., (2006). Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, June 2006. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 61.
30. BVL, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2016). Guidelines for the single-laboratory validation of quantitative PCR methods. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, Germany.
31. Carn V.M. and Kitching R.P., (1995). The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (*Neethling*) virus. *Arch. Virol.*, 140, 503-513.
32. Carn V.M., (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, 11, 1275-1279.
33. Chand P., Kitching R.P., Black D.N., (1994). Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripoxvirus and contagious pustular dermatitis infections in sheep. *Epidemiol. Infect.* 113, 377–385.
34. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol. Infect.* 126, 317-321.
35. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S., (2003). Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med. Vet. Entomol.*, 17, 294-300.
36. Coetzer J.A.W., (2004). Lumpy skin disease. In: *Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer J.A.W. and Tustin R.C. (eds), 2nd edn., 1268-1276. University Press Southern Africa, Oxford.
37. Coetzer J.A.W., Tuppurainen E., Babiuk S., Wallace D.B., (2018). Lumpy skin disease. In: *Infectious Diseases of Livestock, Part II*. Anipedia, <https://www.researchgate.net/publication/326258692>
38. Davies F.G., (1982). Observations on the epidemiology of lumpy skin disease in Kenya. *J. Hyg. (Lond.)*, 88, 95-102.
39. Davies F.G., (1991a). Lumpy skin disease of cattle: A growing problem in Africa and the near east. *World Animal Review*, 37: 42.
40. Davies F.G., (1991b). Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. *Br. Vet. J.*, 147, 489-503.
41. De Clercq E.M., Vanwambeke S.O., Sungirai M., Adehan S., Lokossou R., Madder M., (2012). Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. *Exp. Appl. Acarol.*, 58, 441-452.
42. Diesel A.M., (1949). The Epizootiology of Lumpy Skin Disease in South Africa. In *Proceedings of the 14th International Veterinary Congress, London, U.K.*, pp: 492-500.
43. Dietze K., Moritz T., Alexandrov T., Krstevski K., Schlottau K., Milovanovic M., Hoffmann D., Hoffmann B., (2018). Suitability of group-level oral fluid sampling in ruminant populations for lumpy skin disease virus detection. *Veterinary Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.022>
44. EFSA (European Food Safety Authority), (2016a). Strengthening regional cooperation in South East Europe and Middle East for prevention and control of Lumpy Skin Disease (LSD). EFSA supporting publication 2016: EN-1059, APPROVED: 4 July 2016 19 pp.
45. EFSA (European Food Safety Authority), (2017). Lumpy skin disease: I. Data collection and analysis. APPROVED: 27 March 2017. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4773

46. EFSA (European Food Safety Authority), (2018a). Lumpy skin disease: scientific and technical assistance on control and surveillance activities. *EFSA Journal* 2018;16 (10):5452, 46 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5452
47. EFSA (European Food Safety Authority), (2018b). Lumpy skin disease II. Data collection and analysis. *EFSA J.* 16 (2), 33. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5176>. 5176
48. EFSA (European Food Safety Authority), (2020). Lumpy skin disease epidemiological report IV: data collection and analysis. *EFSA Journal* 2020;18(2):6010. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6010
49. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), (2015). Scientific Opinion on lumpy skin disease. *EFSA Journal* 2015; 13:3986, 73 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3986
50. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), (2016b). Statement: Urgent advice on lumpy skin disease. *EFSA Journal* 2016; 14:4573, 27 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4573
51. Elhaig M.M., Selim A., Mahmoud M., (2017). Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 84(1), a1393. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1393>
52. El-Nahas E.M., El-Habbaa A.S., El-bagoury G.F., Mervat E.I. Radwan: (2011). Isolation and Identification of Lumpy Skin Disease Virus from Naturally Infected Buffaloes at Kaluobia, Egypt, *Global Veterinaria* 7 (3): 234-237, ISSN 1992-6197.
53. El-Neweshy M.S., El-Shemey T.M., Youssef S.A., (2012). Pathologic and Immunohistochemical Findings of Natural Lumpy Skin Disease in Egyptian Cattle. *Pakistan Veterinary Journal* ISSN: 0253-8318 (print), 2074-7764 (online).
54. FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee (RSSC), (2019).
55. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., Bayissa B., Ayelet G., Oura C.A.L., Roger F., Tuppurainen E.S.M., (2015). Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus, *Vaccine* 33 (2015) 3256–3261.
56. Gari G., Bonnet P., Roger F. and Waretszkuta A. (2011). Epidemiological aspects and financial impact of lumpy skin disease in Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 102, 274-283.
57. Gelaye E., Belay A., Ayelet G., Jenberie S., Yami M., Loitsch A., Tuppurainen E., Grabherr R., Diallo A., Lamien C. E., (2015). Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antiviral Research* 119 (2015) 28–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.008>
58. Gelaye E., Lamien C.E., Silber R., Tuppurainen E.S.M., Grabherr R., Diallo A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, 8 (10).
59. Greth A., Gourreau J.M., Vassart M., Nguyen B.A.V., Wyers M. and Lefevre P.C. (1992). Capripoxvirus disease in an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia. *J. Wild. Dis.* 28, 295-300.
60. Haegeman A., De Vleeschauwer A., De Leeuw I., Vidanović D., Šekler M., Petrović T., Demarez C., Lefebvre D., De Clercq K., (2019). Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections, *Preventive Veterinary Medicine* (in press), <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104704>

61. Heine H.G., Stevens M.P., Foord A.J., Boyle D.B., (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J. Immunol. Methods.* 227(1-2), 187-196.
62. International Committee on Taxonomy of Viruses, *Virus Taxonomy: 2017 Release.*
63. Ireland D.C. and Binopal Y.S., (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods* 74, 1–7.
64. Irons P.C., Tuppurainen E.S.M. and Venter E.H., (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, 63, 1290-1297.
65. Kahana-Sutin E., Klement E., Lensky I., Gottlieb Y., (2017). High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms. *Medical and Veterinary Entomology* 31(2): 150-160. doi: 10.1111/mve.12217
66. Kara P., Afonso C., Wallace D. et al., (2003). Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus *Arch Virol* 148: 1335. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0102-0>
67. Kasem S., Saleh M., Qasim I., Hashim O., Alkarar A., Abu-Obeida A., Gaafer A., Hussien R., Al-Sahaf A., Al-Doweriej A., Bayoumi F., Hodhood A., Abdelatif M., (2018). Outbreak investigation and molecular diagnosis of Lumpy skin disease among livestock in Saudi Arabia 2016. *Transbound Emerg Dis.* 65(2): e494-e500. doi: 10.1111/tbed.12769
68. Katsoulos P.D., Chaintoutis S.C., Dovas C.I., Polizopoulou Z.S., Brellou G.D., Agianniotaki E.I., Tasioudi K.E., Chondrokouki E., Papadopoulos O., Karatzias H., Boscoc C., (2017). Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. *Transboundary Emerging Disease*, 65:174-185.
69. Kitching R.P. and Smale C., (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, 41, 425-427.
70. Kitching R.P., (2003). Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. In *Vaccines for OIE list A and emerging animal diseases*, Sept. 2002, Ames, Iowa, USA, 16-18, 161-167, CABI: 20033214751.
71. Klement E., Broglia A., Antoniou S.E., Tsiamadis E., Plevraki E., Petrović T., Polaček V., Debeljak Z., Miteva A., Alexandrov T., Marojevic D., Pite L., Kondratenko V., Atanasov Z., Gubbins S., Stegeman A., Cortinas Abrahantes J., (2018). Neethling vaccine proved highly effective in controlling lumpy skin disease epidemics in the Balkans *Prev. Vet. Med.* (2018) (in press), <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.001>
72. Lamien C.E., LeGoff C., Silber R., Wallace D.B., Gulyaz V., Tuppurainen E., Madani H., Caufour P., Adam T., El Harrak M., Luckins A G., Albina E., Diallo A., (2011a). Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: Development of a classical PCR method to differentiate goat poxvirus from sheep poxvirus. *Vet. Microbiol.* 149, 30-39.
73. Lamien C.E., Lelenta M., Goger W., Silber R., Tuppurainen E., Matijevic M., Luckins A.G., Diallo A., (2011b). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J. Virol. Methods*, 171, 134-140.
74. Le Goff C., Lamien C.E., Fakhfakh E., Chadeyras A., Aba-Adulugba E., Libeau G., Tuppurainen E., Wallace D.B., Adam T., Silber R., Gulyaz V., Madani H., Caufour P., Hammami S., Diallo A., Albina E., (2009). Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *J. Gen. Virol.*, 90, 1967-1977.

75. Lojkić I., Šimic I., Krešić N., Bedekovic T., (2018). Complete genome sequence of a lumpy skin disease virus strain isolated from the skin of a vaccinated animal. *Genome Announc* 6:e00482-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00482-18>
76. Lubinga J.C., Tuppurainen E.S.M., Coetzer J.A.W., Stoltz W.H., Venter E.H. (2014). Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Exp. Appl. Acarol.* 62, 67-75.
77. Lubinga J.C., Tuppurainen E.S.M., Mahlare R., Coetzer J.A., Stoltz W.H. and Venter E.H. (2015). Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 174-182.
78. Maclachlan N. J., & Dubovi E. J. (Eds.). (2010). *Fenner's veterinary virology*. Academic press.
79. Mafirakureva P., Saidi B., Mbangi J., (2017). Incidence and molecular characterisation of lumpy skin disease virus in Zimbabwe using the P32 gene, *Tropical Animal Health and Production* Volume 49, Issue 1, Pages 47-54.
80. Magori-Cohen R., Louzoun Y., Herziger Y., Oron E., Arazi A., Tuppurainen E., et al., (2012). Mathematical modelling and evaluation of the different routes of transmission of lumpy skin disease virus. *Vet Res.* 2012;43 (1):1–13
81. Manić M., Stojiljković M., Petrović M., Nišavić J., Bacić D., Petrović T., Vidanović D., Obrenović S., (2019). Epizootic features and control measures for lumpy skin disease in south east Serbia in 2016. 66(5):2087-2099. doi: 10.1111/tbed.13261
82. Mathijs E., Vandenbussche F., Haegeman A., King A., Nthangeni B., Potgieter C., Maartens L., van Borm S., De Clercq K., (2016). Complete Genome Sequences of the Neethling-Like Lumpy Skin Disease Virus Strains Obtained Directly from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. *Genome Announcements.* 4 (1): 1–2. (including a correction to the article: *Genome Announcements.* 5:e01657-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01657-16>).
83. Mellor P.S., Kitching R.P. and Wilkinson P.J., (1987). Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res. Vet. Sci.*, 43, 109-112.
84. Menasherow S., Erster O., Rubinstein-Giuni M., Kovtunenکو A., Eynгор E., Gelman B., Khinich E., Stram Y., (2016). A high-resolution melting (HRM) assay for the differentiation between Israeli field and Neethling vaccine lumpy skin disease viruses. *Journal of Virological Methods* 232:12-15. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.008
85. Menasherow S., Rubinstein-Giuni M., Kovtunenکو A., Eynгор Y., Fridgut O., Rotenberg D., Khinich Y., Stram Y., (2014). Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV). *J. Virol. Methods*, 199, 95-101. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.12.013
86. Mercer J. and Helenius A., (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320, 531-535.
87. Mercier A, Arsevska E, Bournez L, et al. (2018). Spread rate of lumpy skin disease in the Balkans, 2015–2016. *Transbound Emerg Dis.* 2018 Feb; 65 (1): 240-243. doi: 10.1111/tbed.12624
88. Milovanović M., (2019). Ispitivanje imunskog odgovora i prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa kod goveda i novorođene teladi nakon vakcinacije atenuiranim vakcinom (doktorska disertacija). *UDK broj: 578 : 616-022 : 636.2*
89. Milutinović M., Radulović Ž., Tomanović S., Petrović Z., (2012). *Krpelji (Acari: Ixodidae: Argasidae) Srbije*. Monografija. SANU, Beograd.

90. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016a). Pravilnik o dopunama pravilnika o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2016. godinu, Službeni glasnik broj 61/16 od 7. jula 2016. godine. http://www.vet.minpolj.gov.rs/legislativa/pm_2016/Pravilnik%20o%20dopunama%20Pravilnika%20za%20PM%202016.pdf
91. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016b). Instrukcija o postupku donošenja rešenja o prestanku mera na zaraženim gazdinstvima, zaraženom i ugroženom području zbog pojave nodularnog dermatitisa, Beograd, broj: 323-02-2433/2016-05/7. http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/Instrukcija%20o%20postupku%20donosenja%20resenja%20o%20prestanku%20mera%20na%20zarazenim%20gazdinstvima%20zbog%20pojave%20ND.pdf
92. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016c). Regionalnim kriznim centrima: Procedura o načinu postupanja u cilju potvrde slučajeve nodularnog dermatitisa prilikom sprovođenja vakcinacije, Beograd, broj: 323-02-2433/2016-05/6. http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/Procedura%20o%20nacinu%20postupanja%20u%20cilju%20potvrde%20slucaja%20ND%20prilikom%20spvodjenja%20vakcinacije.pdf
93. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016d). Rešenje, Beograd, broj: 119-01-277/2016-05/10. http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/resenje%20o%20zabrani%20prometa%20i%20javnog%20okupljanja.pdf
94. Molini U., Aikukutu G., Khaiseb S., Haindongo N.N., Lilungwe A.C., Cattoli G., Dundon W.G., Lamien C.E., (2018). Molecular characterization of lumpy skin disease virus in Namibia, 2017, Archives of Virology Volume 163, Issue 9, Pages 2525-2529.
95. Molla W, Frankena K, Gari G, Kidane M, Shegu D, Jong MCM De., (2018). Seroprevalence and risk factors of lumpy skin disease in Ethiopia. *Prev Vet Med* 2018; <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.029>
96. Morris J.P.A., (1931). Psuedo-urticaria. Annual Report 1930, Department of Animal Health, Government Northern Rhodesia, pp. 12.
97. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J., (1999). *Veterinary virology*, 3rd editon. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 282.
98. Ochwo S., Vander Waal K., Munsey A., Nkamwesiga J., Ndekezi C., Auma E., Mwiine F., (2019). Seroprevalence and risk factors for lumpy skin disease virus seropositivity in cattle in Uganda. *BMC Veterinary Research* (2019) 15:236. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1983-9>
99. OIE¹, Office International des Epizooties. (2018): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.4.12, Lumpy Skin Disease. OIE, Paris. Available online, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf
100. OIE², Immediate notification report, Report Date: 08/06/2016, Country: Serbia, OIE World Animal Health Information Database [WAHID]. OIE World Animal Health Information Database http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000020284_20160613_175634.pdf
101. Pelletier C., Adélie M., Laure B., Jean Louis M., Eric S., (2018). Validation of Ready-To-Use Real-Time PCR Kits for Specific and Reliable Detection of Lumpy Skin Disease (LSD) and Distinction with Neethling Vaccine Strain, 11th International Congress for Veterinary Virology 12th Annual Meeting of EPIZONE August 27–30, 2018 University of Veterinary Medicine Vienna.

102. Pestova Y., Artyuchova E., Kostrova E., Kononov A., & Sprygin A. (2018). The development of a real-time PCR assays for the detection of field LSDV genome. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 53, 422–429. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.422eng> (In Russian).
103. Petrović T., Šekler M., Lazić S., Vidanović D., Živulj A., Gujanov V., Bugarski D., Debeljak Z., Lazić G., Lupulović D., Labus T., Plavšić B., (2017). Epizootiološka situacija bolesti kvrgave kože i preliminarni rezultati sprovedenih istraživanja u Srbiji. 28 Savetovanje veterinara Srbije, 07-10 septembar, 2017, 56-72
104. Prozesky L. and Barnard B.J.H., (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49, 167-175.
105. Reed L.J., Muench H., A (1938). Simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, May 1938, Pages 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
106. Republički zavod za statistiku, 2018, Statistički godišnjak Republike Srbije 2018, Beograd. <http://publikacije.stat.gov.rs/G2018/Pdf/G20182051.pdf>
107. RHMZ - Republički hidrometeorološki zavod Srbije, (2016). Godišnji bilten za Srbiju - godina, Odeljenje za monitoring klime i klimatske prognoze, Sektor Nacionalnog centra za klimatske promene, razvoj klimatskih modela i ocenu rizika vremenskih nepogoda, Beograd, 1-30.
108. Rodhain F., (2015). Insects as vectors: systematics and biology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2015;34 (1):83–96.
109. Rouby S., Aboulsoud E., (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *Vet. J.* 209, 193-195.
110. Saegerman C., Bertagnoli S., Meyer G., Ganière J-P., Caufour P., De Clercq K., et al. (2018). Risk of introduction of lumpy skin disease in France by the import of vectors in animal trucks. *PLoS ONE* 13(6): e0198506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198506>
111. Sameea Yousefi P., Dalir-Naghadeh B., Mardani K., Jalilzadeh-Amin G., (2018). Phylogenetic analysis of the lumpy skin disease viruses in northwest of Iran. *Tropical Animal Health and Production* Volume 50, Issue 8, Pages 1851-1858.
112. Sameea Yousefi, P., Mardani K., Dalir-Naghadeh B., Jalilzadeh-Amin G., (2017). Epidemiological Study of Lumpy Skin Disease Outbreaks in North-western Iran. *Transboundary and Emerging Diseases.* 64 (6), 1782–1789. doi:10.1111/tbed.12565
113. Samojlović M., Polaček V., Gurjanov V., Lupulović D., Lazić G., Petrović T., Lazić S., (2019). Detection of antibodies against lumpy skin disease virus by virus neutralization test and ELISA methods. *Acta Veterinaria-Beograd* 2019, 69 (1), 47-60.
114. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (12), 5463-5467.
115. Sevik M. and Dogan M., (2017). Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014–2015, *Transbound Emerg Dis.* 2017 Aug; 64(4):1268-1279. doi: 10.1111/tbed.12501
116. Shoukry A., El-Kady G.A., Merdan A.I., El Said S., (1993). Distribution and host-relationship of ticks (Ixodoidea) infesting domestic animals and rodents in Sinai Peninsula. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 23, 459-469.

117. Sprygin A., Artyuchova E., Babin Y., Prutnikov P., Kostrova E., Byadovskaya O., Kononov A., (2018a). Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016, *Transbound Emerg Dis.* 2018; pp 1–8.
118. Sprygin A., Babin Y., Pestova Y., Kononova S., Byadovskaya O., Kononov A., (2019a). Complete genome sequence of the lumpy skin disease virus recovered from the first outbreak in the Northern Caucasus region of Russia in 2015. *Microbiol Resour Announc* 8:e01733-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01733-18>
119. Sprygin A., Babin Y., Pestova Y., Kononova S., Wallace D.B., Van Schalkwyk A., et al. (2018b). Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLoS ONE* 13(12): e0207480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.020748>
120. Sprygin A., Byadovskaya O., Kononova S., Zakharov V., Pestova Y., Prutnikov P., Kononov A., (2019b). A real-time PCR screening assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA. *BMC Res Notes* (2019) 12:371. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4412-z>
121. Sprygin A., Pestova Y., Prutnikov P., Kononov A., (2018c). Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017. *Transbound Emerg Dis.* 2018 Oct; 65(5):1137-1144. doi: 10.1111/tbed.12897
122. Stubbs S., Oura C.A.L., Henstock M., Bowden T.R., King D.P., Tuppurainen E.S.M., (2012). Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *J. Virol. Methods*, 179 (2): 419–422.
123. Tageldin M.H., Wallace D.B., Gerdes G.H., Putterill J.F., Greyling R.R., Phosiwa M.N., Al Busaidy R.M., Al Ismaaily S.I., (2014). Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. *Trop. Anim. Health Prod.*, 46, 241-246.
124. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
125. Tasioudi K.E., Antoniou S.E., Iliadou P., Sachpatzidis A., Plevraki E., Agianniotaki E.I., Fouki C., Mangana-Vougiouka O., Chondrokouki E., Dile C., (2016). Emergence of Lumpy Skin Disease in Greece, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases.* 63 (2016) 260–265.
126. TFS, 2016. Real-time PCR handbook – 3rd edition. Thermo Fisher Scientific, USA. Retrieved from: <https://www.thermofisher.com>
127. Thomas A.D. and Maré C.V.E., (1945). Knopvelsiekte, *Journal of South African Veterinary Medical Association*, 16: 36–43.
128. Timurkan M.O., Ozkaraca M., Aydın H., Sağlam Y.S., (2016). The detection and molecular characterization of lumpy skin disease virus, northeast Turkey. *International Journal of Veterinary Science*, 5:44–47.
129. Toplak I., Petrovic T., Vidanovic D., Lazic S., Šekler M., Manic M., Petrovic M., Kuhar U., (2017). Complete genome sequence of lumpy skin disease virus isolate Serbia/Bujanovac/2016, detected during an outbreak in the Balkan area. *Genome Announc* 5:e00882-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00882-17>
130. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D.L., (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, 75, 7122-7130.
131. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L., (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, 76, 6054-6061.

132. Tuppurainen E.S.M., Oura C., (2014): Lumpy skin disease: an African cattle disease getting closer to the EU, *Vet. Rec.* 175 (12), 300-301.
133. Tuppurainen E.S.M., (2015a). Evaluation of vector potential of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus decoloratus* ticks for lumpy skin disease virus, academic dissertation.
134. Tuppurainen E.S.M., (2018a). Geographic Distribution of Lumpy Skin Disease, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018 E. S. M. Tuppurainen et al., Lumpy Skin Disease, https://doi.org/10.1007/978-3-319-92411-3_4
135. Tuppurainen E.S.M., Alexandrov T., Beltran-Alcrudo D., (2017). Lumpy skin disease field manual – A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 20. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 60 pages.
136. Tuppurainen E.S.M., and Oura C.A., (2012). Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 40–48. 2012.
137. Tuppurainen E.S.M., Antoniou S.E., Tsiamadis E., Topkaridou M., Labus T., Plavšić B., Debeljak Z., Miteva A., Alexandrov T., Pite L., Boci J., Marojevic D., Kondratenko V., Atanasov Z., Murati B., Acinger-Rogic Z., Kohnle L., Calistri P., Broglia A., (2018b). Field observations and experiences gained from the implementation of control measures against lumpy skin disease in South-East Europe between 2015 and 2017. (In press) *Prev Vet Med.* 2018 Dec 13. pii: S0167-5877(18)30548-8. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.12.006
138. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltsz W.H., Troskie M., Carpenter S.T., Coetzer J.A., Venter E.H., Oura C.A., (2013). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. *Epidemiol. Infect.* 141, 425-430.
139. Tuppurainen E.S.M., Stoltsz W.H., Troskie M., Wallace D.B., Oura C.A., Mellor P. S., Coetzer J.A., Venter E.H., (2010). A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of Lumpy Skin Disease virus in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 93-104. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01184
140. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Coetzer J.A., Bell-Sakyi L., (2014). Lumpy skin disease: Attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick. Born. Dis.* 6, 134-140. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.11.002
141. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Coetzer J.A.W., (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72, 153–164.
142. Tuppurainen, E. S. M. et al., (2019). Field observations and experiences gained from the implementation of control measures against lumpy skin disease in South-East Europe between 2015 and 2017. *Prev. Vet. Med.* S0167–5877(18), 30548–8.
143. Tuppurainen, E. S.M., Venter E.H., Shisler J.L., Gari G., Mekonnen G.A., Juleff N., Lyons N.A., De Clercq K., Upton C., Bowden T.R., Babiuk S., and Babiuk L.A., (2015b). Review: Capripoxvirus, diseases: current status and opportunities for control. *Transbound Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12444
144. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. and Rozen S.G., (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug 1;40 (15):e115.
145. Vandenbussche F., Mathijs E., Haegeman A., Al-Majali A., Van Borm S., De Clercq K., (2016). Complete genome sequence of Capripoxvirus strain KSGP 0240 from a commercial live attenuated vaccine. *Genome Announc* 4(5):e01114-16. doi:10.1128/genomeA.01114-16

146. Vasić A., Zdravkovic N., Dragos A., Bojkovski J., Marinov M., Mathis A., Niculaua M., Oslobanu E. L., Pavlovic I., Petric D., Pflüger V., Pudar D., Savuta G., Simeunovic P., Veronesi E., Silaghi C. and the SCOPES AMSAR training group, (2019). Species diversity, host preference and arbovirus detection of *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) in south-eastern Serbia, *Parasites & Vectors* (2019) 12:61, p 1-9, <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3292-3>
147. Vasković N., Debeljak Z., Vidanović D., Šekler M., Matović K., Aničić M., Marinković D., (2019). Morphological characteristics of skin lesions in cattle naturally infected with lumpy skin disease virus in Serbia. *Acta Veterinaria-Beograd* 2019, 69 (4), 369-378 UDK: 636.2:616.5-002(497.11).
148. Vidanovic D., Sekler M., Petrovic T., Debeljak Z., Vaskovic N., Matovic K., Hoffman B., (2016). Real-time PCR assay for the specific detection of field Balkan strains of Lumpy skin disease virus. *Acta Veterinaria*, 66, 444–454. doi: 10.1515/acve-2016-0038
149. Von Backstrom U., (1945). Ngamiland cattle disease: preliminary report on a new disease, the etiological agent being probably of an infectious nature. *Journal of South African Veterinary Medical Association* 16: 29–35
150. Wainwright S., A. El Idrissi R. Mattioli M. Tibbo F. Njeumi, Raizman E., (2013). Emergence of lumpy skin disease in the Eastern Mediterranean Basin countries. *Empres Watch* 29, 1–6.
151. Weiss K. E., (1968). Lumpy skin disease virus. *Viol. Monogr.*, 3, 111-131.
152. World Organisation for Animal Health (OIE). (2017). Aethiology epidemiology diagnosis prevention and controle references. OIE Paris. 1-5. Available online at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/LUMPY_SKIN_DISEASE_FINAL.pdf
153. World Organisation For Animal Health, Terrestrial animal health code, volume I, 2011. Available online at: <https://www.oie.int/doc/ged/D10905.PDF>
154. Ye Jian, Coulouris George, Zaretskaya Irena, Cutcutache Ioana, Rozen Steve & Madden Thomas L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BioMed Central: The Open Acces Publisher*. Retrieved at October 10, 2012, from the website temoa: Open Educational Resources (OER) Portal at <http://temoa.tec.mx/node/439091>
155. Yeruham I., Nir O., Braverman Y., Davidson M., Grinstein H., et al. (1995). Spread of lumpy skin disease in Israel dairy herds. *VetRec* 137: 91-93.
156. Zeynalova S., Asadov K., Guliyev F., Vatani M., Aliyev V., (2016). Epizootology and Molecular Diagnosis of Lumpy Skin Disease among Livestock in Azerbaijan. *Front. Microbiol.* 7:1022. doi: 10.3389/fmicb.2016.01022

Lista skraćenica

AGID - agar gel imunodifuzioni test

BKK – bolest kvrgave kože

CaPV - *Capripoxvirus*

DIVA – *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EEV gen - *Extracellular Enveloped Virions gene*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (imunoenzimska imunološka metoda)

GPCR - *G-protein coupled chemokine receptor host-specific*

GTPV – *Goatpox virus* (virus boginja koza)

IFAT – indirect fluorescent antibody test (test indirektne imunofluorescencije)

LSD - *Lumpy skin disease*

MDBK – *Madin-Darby bovine kidney* (ćelijska linija poreklom od bubrega goveda)

iRNK – informaciona RNK

OIE – *Office International des Epizooties (The World Organization for Animal Health)* (Svetska organizacija za zdravlje životinja)

ORF - *Open reading frame*

PBS – fosfatni slani pufer

PCR – *polymeraze chain reaction* (lančana reakcija polimeraze)

Real-Time PCR - *real-time polymeraze chain reaction* (lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu)

SPPV – *Sheeppox virus* (virus boginja ovaca)

TCID₅₀ – *tissue culture infective dose* (infektivna doza za 50% kulture tkiva)

VNT – virus neutralizacioni test

PRILOG 1. Usporedni prikaz rezultata primenom šest različitih PCR/real-time protokola

Vrsta materijala	Oznaka uzorka	PCR/real-time PCR protokol						qPCR rezultat	Rezultat protokola prema Menasherowu
		Bowden	KV-2	Terenski Niš	Vakcinalni Niš	KV-vac			
		Cq (Δ R)	Cq (Δ R)	Cq (Δ R)	Cq (Δ R)	Cq (Δ R)			
Bioptat	RS7116702821	21,18	20,05	20,19	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	CS7110058342	20,36	20,44	21,07	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	CS7121755008	20,46	18,24	18,94	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	CS7132199834	23,64	25,74	26,47	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	CS7190067026	24,77	20,85	26,38	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7104159333	18,57	18,33	19,54	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7115499552	17,29	16,70	16,91	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7124160590	19,34	19,09	19,73	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7124224733	19,09	17,34	17,76	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7116720047	17,59	16,06	18,31	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7124615618	34,68	23,26	24,30	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7132756596	14,54	16,63	17,23	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7134615632	20,75	16,82	16,65	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7135252333	20,18	18,66	18,80	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7136669726	18,45	20,04	20,56	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7143344429	30,83	31,25	32,39	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7144000770	26,25	26,39	27,11	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7146714686	20,03	21,56	21,87	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7183999233	29,56	30,53	32,69	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7184224297	28,26	30,89	31,93	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7174223632	25,58	24,85	26,48	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7174615600	21,19	21,14	20,49	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7176669654	18,79	16,19	17,89	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7156669749	17,43	16,21	18,22	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7156669792	20,66	18,73	18,95	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7103343243	23,27	20,57	17,13	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	CS7180050432	16,20	14,34	15,61	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7113999868	30,18	31,54	31,14	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7122853946	16,07	15,25	15,64	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7124399356	17,07	18,13	15,79	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7125951665	20,80	19,19	20,17	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7133889487	16,26	16,18	16,75	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7144225859	25,27	23,46	22,50	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7146732647	32,27	31,30	29,30	No Cq	/	terenski	Neg.	
Bioptat	RS7153583546	17,31	17,24	17,24	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7153887190	17,90	16,99	17,18	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7156726702	16,21	16,10	16,03	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7162855986	19,83	17,28	17,94	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7163077806	19,96	20,89	21,46	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7163386135	29,68	28,92	30,34	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7163432156	18,16	18,27	18,73	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7166695385	36,59	38,42	37,49	No Cq	/	terenski	Neg.	
Bioptat	RS7170095271	19,36	18,20	19,55	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7171699717	20,61	21,19	22,30	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7173107879	14,07	14,16	14,55	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7190059856	17,50	17,60	17,82	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7196723886	16,10	17,93	18,05	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7145939601	17,04	17,00	17,49	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7190102770	17,70	19,14	18,13	No Cq	/	terenski	terenski	
Bioptat	RS7194161124	18,59	17,69	17,06	No Cq	/	terenski	terenski	

Bioptat	1/b	24,72	22,56	21,64	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	2/b	16,61	16,19	23,98	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	3/b	24,25	25,39	27,81	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	4/b	17,31	16,24	20,94	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	5/b	19,07	18,13	22,79	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	6/b	16,10	16,23	21,59	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	7/b	20,18	18,16	24,03	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	8/b	19,89	17,73	21,85	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	9/b	17,90	16,69	20,96	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	10/b	18,29	14,34	19,37	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	11/b	17,04	16,00	21,52	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	12/b	17,50	17,60	19,64	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	13/b	16,21	15,10	18,41	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	14/b	17,85	14,16	17,47	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	15/b	15,74	15,25	18,08	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	16/b	25,27	23,46	26,87	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	17/b	19,83	17,28	22,89	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Bioptat	18/b	34,59	33,02	37,17	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Krv	RS7116702821	20,80	19,09	23,43	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7110058342	30,75	32,67	33,96	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7121755008	26,50	28,16	28,77	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7132199834	25,11	27,96	27,23	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7190067026	31,58	33,03	35,32	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7104159333	30,15	32,29	33,82	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7115499552	23,35	22,14	25,63	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7124160590	28,84	27,03	30,93	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7124224733	30,11	33,46	34,48	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7116720047	27,73	29,24	29,36	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7124615618	30,28	31,69	32,66	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7132756596	23,35	25,25	25,76	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7134615632	26,66	28,23	29,74	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7135252333	29,47	31,65	35,22	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7136669726	30,51	32,07	33,82	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7143344429	34,59	No Cq	37,58	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7144000770	25,89	27,76	29,85	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7146714686	30,60	31,71	32,92	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7183999233	27,80	29,87	33,30	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7184224297	36,33	No Cq	No Cq	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7174223632	28,33	29,87	30,37	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7174615600	36,38	38,61	38,99	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7176669654	26,54	28,26	28,88	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7156669749	25,43	26,79	27,15	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7156669792	30,16	31,39	34,18	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7191752695	26,54	29,57	32,45	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7104224022	30,51	32,07	32,28	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7103112214	27,72	31,08	33,89	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7110067073	27,28	29,46	32,76	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	CS7112073703	25,20	27,14	31,54	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7113999444	27,94	29,92	32,93	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7114469900	23,76	25,89	27,40	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7134669998	27,74	29,92	29,53	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7156477934	32,36	33,85	33,86	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7156695381	24,40	26,70	28,99	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7162855986	25,19	27,60	30,55	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7163386135	30,93	33,54	34,84	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7163775045	25,80	28,15	29,87	No Cq	/	terenski	terenski

Krv	RS7166661744	31,30	34,28	36,64	No Cq	/	terenski	Neg.
Krv	RS7166695385	28,28	30,96	32,43	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7170095271	30,18	32,51	33,79	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7171699717	28,62	30,02	30,64	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7172574028	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
Krv	RS7173107879	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
Krv	RS7176669729	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
Krv	RS7183887476	28,14	30,04	31,75	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7192571873	29,13	30,86	32,27	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	RS7196714603	24,93	26,84	28,33	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	4	28,43	30,25	33,83	No Cq	/	terenski	terenski
Krv	5	28,62	30,02	29,14	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Krv	1/k	29,88	31,59	33,87	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Krv	2/k	25,29	27,96	27,12	23,21	22,96	terenski+ vakcinalni	terenski+ vakcinalni
Krv	3/k	36,38	38,61	37,19	No Cq	No Cq	terenski	Neg.
Krv	4/k	30,26	31,39	30,28	No Cq	No Cq	terenski	terenski
Krv	5/k	29,77	31,65	29,16	24,12	23,67	terenski+ vakcinalni	terenski+ vakcinalni
nosni bris	RS7116702821	24,19	26,76	25,89	No Cq	/	terenski	terenski
nosni bris	RS7145939601	17,98	19,58	18,46	No Cq	/	terenski	terenski
nosni bris	RS7174159462	29,50	31,84	30,14	No Cq	/	terenski	Neg.
nosni bris	CS7180062411	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
nosni bris	RS7190102770	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
nosni bris	RS7194161124	27,40	28,91	27,30	No Cq	/	terenski	terenski
nosni bris	1/s	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	/	Neg.	Neg.
nosni bris	2/s	25,37	27,41	26,77	No Cq	/	terenski	terenski
nosni bris	3/s	15,69	17,94	17,67	24,61	24,25	terenski+ vakcinalni	terenski+ vakcinalni
nosni bris	4/s	27,76	28,74	28,75	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	5/s	27,12	27,85	26,04	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	6/s	20,96	18,95	18,26	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	7/s	23,56	24,38	24,06	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	8/s	31,64	32,57	33,04	No Cq	No Cq	terenski	Neg.
nosni bris	9/s	32,75	32,47	31,38	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	10/s	32,01	32,61	32,01	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	11/s	32,38	32,54	32,09	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	12/s	31,23	32,48	32,27	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	13/s	27,25	27,92	26,24	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	14/s	22,78	26,65	23,12	No Cq	No Cq	terenski	terenski
nosni bris	15/s	35,67	33,85	34,05	25,91	25,22	terenski+ vakcinalni	vakcinalni
nosni bris	16/s	21,18	22,47	21,23	No Cq	No Cq	terenski	terenski
krv	2161k/5	32,58	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	2212k/5	28,04	No Cq	No Cq	28,61	27,36	vakcinalni	vakcinalni
krv	3507k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3511k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3513k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3514k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3516k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3518k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3520k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3531k/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	2161b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	2212b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3507b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3511b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.

nosni bris	3513b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3514b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3516b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3518b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3520b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3531b/5	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	2161k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	2212k/10	29,19	No Cq	No Cq	27,53	27,83	vakcinalni	vakcinalni
krv	3507k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3511k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3513k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3514k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3516k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3518k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3520k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
krv	3531k/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	2161b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	2212b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3507b/10	28,14	No Cq	No Cq	28,70	28,17	vakcinalni	vakcinalni
nosni bris	3511b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3513b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3514b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3516b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3518b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3520b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.
nosni bris	3531b/10	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	Neg.	Neg.

BIOGRAFIJA

Marija Manić rođena je 18. decembra 1986. godine u Vranju. Osnovnu školu završila je u selu Klenike, opština Bujanovac. Srednju poljoprivredno – veterinarsku školu „Stevan Sindelić“ smer veterinarski tehničar završila je kao đak generacije 2005. godine u Vranju. Prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine, a diplomirala u novembru 2010. godine, prva u svojoj generaciji, sa prosečnom ocenom položenih ispita 9,67. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije (2007-2009), a na završnoj godini studija (2009-2010 godine) bila je stipendista Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije, Fonda za mlade talente. Od strane Univerziteta u Beogradu dodeljena joj je povelja za studenta generacije.

Od januara 2011. godine stažirala je u veterinarskoj stanici “Bujanovac” iz Bujanovca. Od februara 2012. do maja 2014. godine radila je kao istraživač pripravnik na nacionalnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Ekološka i virusološka istraživanja prisustva emerging zoonoza u rezervatima prirode Republike Srbije“ (rukovodilac prof. dr Bosiljka Đuričić, evidencioni broj TR 37015, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela). Od maja 2014. godine do danas radi u Veterinarskom specijalističkom institutu “Niš“ gde obavlja poslove saradnika u Službi za kliničku mikrobiologiju, serologiju i parazitologiju i Službi za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku.

U oktobru 2016. godine završila je specijalizaciju na Katedri za mikrobiologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, čime je stekla zvanje doktor veterinarske medicine – specijalista uže specijalnosti iz oblasti mikrobiologija sa imunologijom.

Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine. Ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,27.

Učestvovala je u brojnim simpozijumima i konferencijama. Do sada je kao autor i koautor objavila više od 30 radova od kojih je pet publikovano u međunarodnim časopisima sa SCI liste, a četiri u časopisima nacionalnog značaja. Ostali radovi su objavljeni na skupovima nacionalnog i međunarodnog karaktera.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Марија Манић

број уписа: 15/17

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Примена молекуларних метода у дијагностици болести квргаве коже говеда на територији Републике Србије и њихов значај у процени епизоотиолошке ситуације“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 17. 09. 2020

М. Манић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Манић

Број уписа: 15/17

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Примена молекуларних метода у дијагностици болести квргаве коже говеда на територији Републике Србије и њихов значај у процени епизоотиолошке ситуације“

Ментор: др Соња Обреновић, ванредни професор

др Дејан Видановић, виши научни сарадник

Потписани: Марија Манић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 17. 09. 2020

M. Manić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Примена молекуларних метода у дијагностици болести квргаве коже говеда на територији Републике Србије и њихов значај у процени епизоотиолошке ситуације“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.09.2020

M. Maruž

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.