

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6  
7 I PODACI O KOMISIJI:

8  
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10  
11 Nastavno – naučno Veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu je  
12 na svojoj 185. sednici održanoj 18.04.2018. godine imenovalo Komisiju za ocenu završene  
13 doktorske disertacije kandidata dr. vet. med. Andree Radalj.

14  
15 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže  
16 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,  
17 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 18  
19 1. Dr Nenad Milić, redovni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2005. godine, Fakultet  
20 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
21 2. Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014. godine, Fakultet  
22 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
23 3. Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2016. godine, Fakultet  
24 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
25 4. Dr Miroslav Valčić, redovni profesor, Zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, 2010. godine,  
26 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
27 5. Dr Tanja Jovanović, redovni profesor, Mikrobiologija i imunologija, 2002. godine, Medicinski  
28 fakultet Univerziteta u Beogradu  
29

30  
31 II PODACI O KANDIDATU:

32  
33 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Andrea, Srđan, Radalj

34  
35 2. Datum rođenja, opština, Republika: 05.06.1989. godine, Savski venac, Beograd,  
36 Republika Srbija

37  
38 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*:

39  
40 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:

41  
42 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: Identifikacija i molekularna karakterizacija  
43 herpesvirusa konja

44  
45 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,  
46 grafikona i sl.): Doktorska disertacija kandidata dr.vet.med. Andree Radalj napisana je na  
47 ukupno 180 strana kompjuterski otkucanog teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (35  
48 strana), Pregled literature (24 strane), Cilj i zadaci ispitivanja (2 strane), Materijal i metode  
49 ispitivanja (26 strana), Rezultati ispitivanja (47 strana), Diskusija (15 strana), Zaključci (2  
50 strane), Spisak literature (29 strana), Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku.  
51 Disertacija je dokumentovana sa 34 slike i 26 tabela.

52  
53 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis  
54 svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i  
55 zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –  
56 nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u  
57 doktorskoj disertaciji):

58 U poglavlju **Uvod** kandidat je detaljno prikazao osnovne morfološke i biološke  
59 osobine herpesvirusa konja sa posebnim osvrtom na karakteristike njihovih genoma. U ovom  
60 poglavlju navedena je taksonomija herpesvirusa uz prikaz filogenetskog stabla familije

1 *Herpesviridae* sa naznačenim pozicijama konjskih herpesvirusa 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4) koji  
2 pripadaju podfamiliiji *Alphaherpesvirinae* i konjskih herpesvirusa 2 i 5 (EHV-2 i EHV-5) iz  
3 podfamiliije *Gammaherpesvirinae*. Pored toga, opisane su osnovne karakteristike replikacije  
4 herpesvirusa kao i mehanizam ostvarivanja latentne infekcije na nivou ćelije prijemčivih  
5 organizama. U uvodu su detaljno opisane epizootologija, patogeneza i klinička slika oboljenja  
6 izazvanih konjskim herpesvirusima 1, 4, 2 i 5. U ovom delu doktorske disertacije kandidat je  
7 naveo i opisao najznačajnije dijagnostičke metode koje se koriste u cilju detekcije i  
8 identifikacije konjskih herpesvirusa u različitim vrstama uzoraka. Posebno je istaknut značaj  
9 primene molekularnih dijagnostičkih metoda koje se zasnivaju na lančanoj reakciji polimeraze  
10 (PCR) u cilju brze i precizne identifikacije EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 direktno iz uzoraka  
11 poreklom od konja sa osvrtom na njihovu specifičnost i značaj u detekciji latentno inficiranih  
12 konja, odnosno mešovitih infekcija izazvanih sa više konjskih herpesvirusa. Pored toga,  
13 kandidat ističe i značaj metode sekvenciranja virusnog genoma u cilju utvrđivanja sličnosti i  
14 razlika između različitih sojeva konjskih herpesvirusa kao i detekcije pojedinih genetskih  
15 mutacija kod navedenih virusa.

16  
17 U poglavlju **Pregled literature** kandidat je prikazao rezultate istraživanja domaćih i  
18 stranih autora koji se odnose na primenu klasičnih i molekularnih metoda virusološke  
19 dijagnostike u cilju izolacije i/ili identifikacije konjskih herpesvirusa 1, 2, 4 i 5. Ovo poglavlje se  
20 sastoji iz dva dela. U prvom delu kandidat je jasno i pregledno prikazao literaturne podatke  
21 koji se odnose na konjske herpesviruse 1 i 4, dok je u drugom delu opisao rezultate ispitivanja  
22 stranih autora vezane za konjske herpesviruse 2 i 5. Kandidat je u oba navedena dela  
23 prikazao istorijat proučavanja herpesvirusnih infekcija konja od prvih podataka o izolaciji i/ili  
24 identifikaciji EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 sa osvrtom na napretke u dijagnostičkim  
25 procedurama, a zaključno sa najsavremenijim molekularnim tehnikama. Detaljno su izloženi  
26 rezultati radova koji se odnose na izolaciju i identifikaciju navedenih virusa iz uzoraka nosnih  
27 briseva i organa konja sa osvrtom na značaj pojedinih klasičnih i molekularnih metoda u  
28 otkrivanju latentnih herpesvirusnih infekcija konja. Navedeni su i literaturni podaci koji se  
29 odnose na mogućnost primene metode Nested multiplex PCR u detekciji mešovitih infekcija  
30 životinja sa većim brojem konjskih herpesvirusa. Posebna pažnja posvećena je literaturi koja  
31 se odnosi na primenu metode sekvenciranja genoma konjskih herpesvirusa u cilju detekcije  
32 mutacija na nivou pojedinačnih nukleotida koje određuju geografsku pripadnost sojeva EHV-  
33 1, odnosno pripadnost sojeva pomenutog virusa neurovirulentnom genotipu. Pored toga,  
34 navedeni su rezultati ispitivanja različitih autora koja su se odnosila na primenu filogenetske  
35 analize u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između sojeva EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 iz  
36 celog sveta. Navedeni literaturni podaci u potpunosti opravdavaju postavljeni cilj i zadatke  
37 ispitivanja.

38  
39 U poglavlju **Cilj i zadaci ispitivanja** kandidat je imajući u vidu dostupne literaturne  
40 podatke kao i rezultate sopstvenih preliminarnih ispitivanja postavio za cilj ove doktorske  
41 disertacije da izvrši identifikaciju i molekularnu karakterizaciju sojeva herpesvirusa konja  
42 poreklom iz uzoraka od konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske kao i  
43 arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine  
44 Univerziteta u Beogradu. Delovi nukleotidnih sekvenci identifikovanih sojeva virusa EHV-1,  
45 EHV-4, EHV-2 i EHV-5 čiji je redosled utvrđen primenom molekularnih metoda bili su  
46 upoređivani sa nukleotidnim sekvencama navedenih vrsta herpesvirusa izolovanih u drugim  
47 delovima sveta koje se nalaze u bazi nukleotidnih sekvenci u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika  
48 između njih. Pored ovoga, cilj ove doktorske disertacije bio je i utvrđivanje mesta  
49 identifikovanih sojeva herpesvirusa izolovanih kod konja sa područja Republike Srbije i  
50 Republike Srpske na filogenetskom stablu, odnosno njihove pripadnosti određenom genotipu.  
51 Radi ispunjenja navedenih ciljeva, kandidat je postavio sledeće zadatke:

52 1. Da se izvrši prikupljanje uzoraka nosnih briseva konja sa ergela i individualnih  
53 gazdinstava kao i uzoraka submandibularnih limfnih čvorova, slezine, kičmene moždine i  
54 produžene moždine konja iz klanice;

55 2. Da se prikupljeni uzorci nosnih briseva i organa laboratorijski obrade radi izvođenja  
56 klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike;

57 3. Da se izvrši identifikacija konjskih herpesvirusa 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4) primenom  
58 metoda izolacije virusa na kulturi tkiva, virus neutralizacije, direktne imunofluorescencije i  
59 lančane reakcije polimeraze (PCR) i identifikacija konjskih herpesvirusa 2 i 5 (EHV-2 i EHV-5)  
60 primenom metoda izolacije virusa na kulturi tkiva i PCR.

1 4. Da se u cilju otkrivanja prisustva nukleinske kiseline virusa EHV-1, EHV-4, EHV-2 i  
2 EHV-5 u uzorcima nosnih briseva i organa konja primeni metoda Nested multiplex PCR.

3 5. Da se izvrši sekvenciranje dela genoma identifikovanih sojeva EHV-1, EHV-4,  
4 EHV-2 i EHV-5 koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) primenom metode po Sanger-u.

5 6. Da se uporede sekvence identifikovanih sojeva herpesvirusa konja sa teritorije  
6 Republike Srbije i Republike Srpske kao i arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju  
7 Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa nukleotidnim sekvencama sojeva  
8 herpesvirusa izolovanih kod konja u drugim delovima sveta koje se nalaze u bazi nukleotidnih  
9 sekvenci u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih.

10 7. Da se izvrši filogenetska analiza identifikovanih sojeva herpesvirusa konja sa  
11 teritorije Republike Srbije i Republike Srpske (BiH).

12 8. Da se izvrši sekvenciranje dela ORF30 regiona genoma identifikovanih sojeva  
13 virusa EHV-1 u ispitivanim uzorcima kao i arhiviranih sojeva virusa metodom po Sanger-u i  
14 odredi redosled nukleotida u regionu ORF30 genoma EHV-1, odnosno eventualno prisustvo  
15 supstitucije adenina (A) guaninom (G) na poziciji 2254 navedenog gena.

16 9. Da se izvrši sekvenciranje dela ORF68 regiona genoma EHV-1 primenom metode  
17 po Sanger-u i izvrši određivanje redosleda nukleotida u regionu ORF68 genoma EHV-1 sa  
18 filogenetskom analizom čime se omogućuje grupisanje izolata ovog virusa prema  
19 geografskom poreklu.

20 U poglavlju **Materijal i metode ispitivanja** kandidat je detaljno opisao materijal i  
21 metode koje je koristio tokom izrade doktorske disertacije.

22 Uzorci za ispitivanja poreklom od ukupno 137 nevakcinisanih konja sa ergela i iz  
23 privatnog sektora obuhvatali su 112 uzoraka nosnih briseva i 100 uzoraka organa  
24 (submandibularni limfni čvorovi, slezina, produžena moždina i kičmena moždina prikupljeni od  
25 25 konja iz klanice). Pored navedenih uzoraka ispitivanjima je podvrgnuto i 5 arhiviranih  
26 sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u  
27 Beogradu. Uzorci nosnih briseva su prikupljeni od konja sa teritorije Republike Srbije i  
28 Republike Srpske dok su uzorci organa poreklom od konja iz klanice sa teritorije Republike  
29 Srbije. Arhivirani sojevi EHV-1 su liofilizati pomenutog virusa izolovani osamdesetih godina  
30 prošlog veka iz uzoraka pobačenih fetusa konja, kao i iz uginule novorođene ždrebadu sa  
31 ergele „Ljubičevo“.

32 Prikupljeni uzorci nosnih briseva i organa konja su primenom klasičnih i molekularnih  
33 metoda virusološke dijagnostike ispitivani na prisustvo konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 (EHV-  
34 1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5), dok su arhivirani sojevi umnoženi i ispitivani primenom  
35 molekularnih metoda u cilju njihove molekularne karakterizacije. Prikupljeni uzorci nosnih  
36 briseva i organa su bili potapani u 2 ml hranljive podloge Eagle MEM sa 2% fetalnog telećeg  
37 seruma i dodatkom antibiotika i antimikotika i čuvani na temperaturi od -20°C do početka  
38 ispitivanja.

39 Za izvođenje metoda izolacije virusa i testa virus neutralizacije (VN testa) korišćen je  
40 sledeći materijal:

41 -Referentni soj EHV-1, titra 6,25 log<sub>10</sub> TCID<sub>50%</sub> umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13 (Rabbit  
42 Kidney 13), dobijen ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije;

43 -Izolovani referentni soj EHV-4, titra 3,5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50%</sub> iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju  
44 umnožavan u ćelijskoj liniji Vero;

45 -Izolovani referentni soj EHV-2, titra 3,3 log<sub>10</sub> TCID<sub>50%</sub> iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju  
46 umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13;

47 -Izolovani referentni soj EHV-5, titra 3,9 log<sub>10</sub> TCID<sub>50%</sub> iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju  
48 umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13;

49 -Kontinuirane ćelijske linije Rabbit Kidney 13 (RK-13, ATCC CCL-37, IZSBS, Breša, Italija) i  
50 Vero (Vero, ATCC CCL-81, IZSBS, Breša, Italija) nabavljene ljubaznošću Naučnog instituta  
51 za veterinarstvo Srbije;

52 -Podloga za rast i održavanje ćelijske linije - minimalni esencijalni medijum (MEM, Capricorn  
53 Scientific, Nemačka) sa 2% i 10% fetalnog telećeg seruma (FBS-12A, Capricorn Scientific,  
54 Nemačka);

55 -Poliklonski imuni serum protiv EHV-1 i EHV-4 (referentni serum Naučnog instituta za  
56 veterinarstvo Srbije ispitan prema sertifikovanom referentnom serumu EURL);

57 Za izvođenje metode direktne imunofluorescencije korišćen je sledeći materijal:

58 -FITC konjugat za EHV-1 i EHV-4, poliklonski imuni serum konjugovan fluorescein  
59 izotiocijanatom - FITC (CJ-F-ERV, VMRD, SAD);

60 -Fosfatni slani pufer pH 7,2, aceton, destilovana voda;

1 Za izvođenje metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) u cilju amplifikacije delova  
2 gena ORF30 i ORF68 EHV-1 i Nested multiplex PCR u cilju difrencijacije EHV-1, EHV-4,  
3 EHV-2 i EHV-5 korišćen je sledeći materijal:  
4 -Ekstrakcija virusne DNK vršena je upotrebom dijagnostičkog kita GeneJet Genomic DNA  
5 Purification Kit (K0721, Thermo Scientific, SAD);  
6 -DreamTaq PCR Master Mix (2X) i voda za PCR (Water, nuclease-free) proizvođača Thermo  
7 Scientific (SAD);  
8 -Parovi oligonukleotidnih prajmera koji u prvoj fazi PCR amplifikuju delove gena koji kodiraju  
9 sintezu glikoproteina B (gB) EHV-1 (forward F: 5'CTTGTGAGATCTAACCGCAC3' i reverse  
10 R: 5'GGGTATAGAGCTTTCATGGG3'), EHV-4 (F: 5'CTTGTGAGATCTAACCGCAC3' i R:  
11 5'GGGTATAGAGCTTTCATGGG3'), EHV-2 (F: 5'GATGGTCTCACCTCTAGCAT3' i R:  
12 5'CTGGTGTAAACACAGGTCTTC 3') i EHV-5 (F: 5'CCAACACAGAAGACAAGGAG3' i R:  
13 5'CACGGTGATACAGTCAGAGA3') proizvođača Metabion International AG, Nemačka;  
14 -Parovi oligonukleotidnih prajmera koji u drugoj fazi PCR amplifikuju delove gena koji kodiraju  
15 sintezu glikoproteina B (gB) EHV-1 (F: 5' ATACGATCACATCCAATCCC3' i R: 5'  
16 GCGTTATAGCTATCACGTCC 3'), EHV-4 (F: 5' ATACGATCACATCCAATCCC 3' i R: 5'  
17 CCTGCATAATGACAGCAGTG 3'), EHV-2 (F: 5' GGTCTCACCTCTAGCATAAC 3' i R: 5'  
18 GCCACACTCTCTTCCTTAGT 3') i EHV-5 (F: 5' CCAACACAGAAGACAAGGAG 3' i R: 5'  
19 AGTTGACCGTTCGTTCTAGTG 3') proizvođača Metabion International AG, Nemačka;  
20 -Parovi oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju deo gena ORF30 koji kodira sintezu DNK  
21 polimeraze EHV-1, proizvođača Metabion International AG, Nemačka (F:  
22 GCTACTTCTGAAAACGGAGGC i R: TATCCTCAGACACGGCAACA);  
23 -Parovi oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju deo gena ORF68 koji predstavlja marker za  
24 grupisanje sojeva EHV-1 po geografskom poreklu proizvođača Metabion International AG,  
25 Nemačka (F: GAAGATAGAATGGGTGTGAG i R: GTCCCCTACCTTTTAACG) i (F:  
26 AGCATTGCCAACAGTTCC i R: CAAGAAACCACTGCTCAACC);  
27 Materijal korišćen za izvođenje elektroforeze:  
28 -50x koncentrovan TAE pufer za elektroforezu, proizvođača Thermo scientific, SAD;  
29 -Etidijum bromid (Serva, Nemačka);  
30 -Agarozna u prahu (Serva, Nemačka);  
31 -Boja za PCR produkte – 5x Loading Dye (Fermentas, SAD);  
32 -Obojen DNK marker - TrackIt 100bp DNA Ladder (Invitrogen, Velika Britanija);  
33 Materijal korišćen za prečišćavanje DNK iz agaroznog gela:  
34 -PureLink Quick Gel Extraction Kit za 50 uzoraka (Invitrogen, Velika Britanija);  
35 Materijal korišćen za prečišćavanje PCR produkata:  
36 -Mini Elute PCR purification kit za 250 reakcija (Qiagen, SAD);  
37 Materijal korišćen za sekvenciranje PCR produkata:  
38 -Formamid, izopropanol, ABI Prism BigDye 3.1 sistem za sekvenciranje (PE Applied  
39 Biosystems, Foster City, CA, SAD) i Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied  
40 Biosystems, Foster City, CA, SAD), parovi prajmera iz prve i druge faze Nested multiplex  
41 PCR za amplifikaciju dela gena koji kodira sintezu glikoproteina B EHV-1, prajmeri iz druge  
42 faze Nested multiplex PCR za amplifikaciju dela gena koji kodira sintezu glikoproteina B EHV-  
43 4, EHV-2 i EHV-5, prajmeri za amplifikaciju dela gena ORF30 EHV-1, prajmeri za  
44 amplifikaciju dela gena ORF68 EHV-1.  
45 Za određivanje nukleotidne homologije, redosleda nukleotida i formiranje  
46 filogenetskih stabala korišćene su sekvence: gB gena sojeva EHV-1, EHV-3 (konjski  
47 herpesvirus 3), EHV-4, EHV-2, EHV-5, HSV-1 (herpes simplex virus tip 1); gp350 gena EBV  
48 (Epstein-Barr virus); ORF30 i ORF68 gena sojeva EHV-1. Sve sekvence preuzete su iz  
49 GenBank baze podataka - NCBI (National Center for Biotechnology Information, National  
50 Institutes of Health) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).  
51 Metode izolacije virusa i testa virus neutralizacije vršene su tako što su obrađeni  
52 uzorci organa i nosnih briseva konja inokulisani u udubljenja mikroploča u kojima je prethodno  
53 postavljena ćelijska linija RK-13. Liofilizovani arhivirani sojevi EHV-1 Katedre za  
54 mikrobiologiju su pre inokulacije resuspendovani u 1 ml podloge MEM sa 2% fetalnog telećeg  
55 seruma. Posle inkubacije inokulisanih ćelijskih linija u trajanju od 1 sat, dodata je podloga za  
56 održavanje - MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma. Referentni soj EHV-1 i izolovani referentni  
57 sojevi EHV-4, EHV-2 i EHV-5 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju inokulisani su u duplikatu  
58 u udubljenja mikroploče, dok su dva neinokulisana udubljenja služila kao negativna kontrola u  
59 ispitivanjima. Mikroploče su zatvorene, oblepljene parafilmom da bi se sprečila evaporacija  
60 podloge i inkubisane na temperaturi od 37°C i u sredini sa 5% CO<sub>2</sub>. Sve inokulisane ćelijske

1 linije u mikropločama su svakodnevno proveravane na prisustvo citopatogenog efekta (CPE).  
2 Posle pojave izraženog CPE, inkubacija je prekidana i materijal sa umnoženim virusom je  
3 zamrzavan. Posle 7 dana, sve ćelije sa inokulisanim uzorcima u kojima nije došlo do pojave  
4 CPE zamrzavane su i odmrzavane 3 puta i nove ćelijske linije su ponovo na prethodno  
5 opisani način inokulisane materijalom iz prve pasaže. Utrošeno vreme za ispitivanje svih  
6 uzoraka na prisustvo EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 iznosilo je ukupno 21 dan (3 pasaže u  
7 trajanju od po 7 dana), a uzorci ispitivanog materijala posle čije inokulacije nije došlo do  
8 pojave citopatogenog efekta posle treće pasaže su proglašavani negativnim na prisustvo  
9 virusa.

10 Uzorci organa, nosnih briseva kao i arhivirani sojevi EHV-1 Katedre za mikrobiologiju  
11 koji su doveli do pojave citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim linijama ispitivani su  
12 metodom neutralizacije virusa (VN testa) na ćelijskoj liniji RK-13 uz korišćenje poliklonskog  
13 imunog seruma protiv EHV-1 i EHV-4 titra 1:128. Svi supernatanti kultura tkiva inokulisanih  
14 ispitivanim uzorcima koji su doveli do pojave CPE su titrirani u razređenjima 1:10 u 7 kolona  
15 mikrotitracione ploče sa 96 udubljenja na ćelijskoj liniji RK-13, a titar virusa je obračunavan  
16 metodom po Kerberu. Neutralizacija virusa je izvođena tako što su u udubljenjima  
17 mikrotitracionih ploča za kulturu tkiva od 96 bunara prethodno napravljena desetostruka  
18 razređenja supernatanta ispitivanih uzoraka pomoću MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma  
19 kao rastvarača. Neutralizacija virusa vršena je u jednom redu razređenja supernatanta  
20 dodavanjem iste zapremine hiperimunog seruma u svako udubljenje, dok je kao kontrola  
21 služio paralelni red mikroploče sa istim desetostрукim razređenjima ispitivanog materijala u  
22 koji je dodat negativan kontrolni serum. Posle inkubacije u trajanju od jednog sata na  
23 temperaturi od 37°C, u svako udubljenje mikroploče dodato je po 50 µl suspenzije ćelija linije  
24 RK-13 u MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma. Mikroploče sa ispitivanim uzorcima su  
25 zatvorene, oplepljene parafilmom i inkubisane na 37°C uz svakodnevno posmatranje na  
26 prisustvo CPE. Titar neutralizacije virusa izračunavan je metodom po Kerberu.

27 Metoda direktne imunofluorescencije izvođena je tako što su svi izolovani sojevi  
28 virusa koji su doveli do pojave citopatogenog efekta inokulisani u ćelijsku liniju RK-13  
29 postavljenu u mikrotitracione ploče sa po 96 udubljenja sa ravnim dnom. Posle inokulacije  
30 virusa svim ćelijskim linijama je dodata podloga za održavanje ćelija - MEM sa 2% fetalnog  
31 telećeg seruma i mešavinom antibiotika i antimikotika. U udubljenja mikrotitracionih ploča sa  
32 ćelijskom linijom je inokulisano po 25 µl ispitujućeg materijala, a u po dva udubljenja su  
33 inokulisani referentni soj EHV-1 i interni referentni soj EHV-4, dok je poslednji red ostao  
34 neinokulisan kao negativna kontrola. Inokulisane ćelijske linije u mikropločama su inkubisane  
35 u termostatu sa 5% CO<sub>2</sub> do pojave CPE koji je zahvatao oko 50% ćelija, posle čega su  
36 ispirane fosfatnim slanim puferom (pH 7,2) i sušene na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta.  
37 Ćelije u udubljenjima mikroploče su fiksirane uz pomoć 100% acetona tokom 10 minuta na  
38 sobnoj temperaturi. Posle fiksiranja, ćelijske linije su sušene na sobnoj temperaturi tokom 10  
39 minuta i u svako udubljenje sa fiksiranim ćelijama dodato je po 50 µl radnog rastvora  
40 konjugata. Inokulisane ćelijske linije u mikrotitracionim pločama su inkubisane u vlažnoj  
41 komori na 37°C tokom 30 minuta posle čega su dva puta ispirane fosfatnim slanim puferom  
42 (pH 7,2) i treći put destilovanom vodom, a zatim sušene na sobnoj temperaturi i posmatrane  
43 pod vidnim poljem fluorescentnog mikroskopa u mračnoj komori. Izražena žuto-zelena  
44 fluorescencija u jedru i citoplazmi inokulisanih ćelija predstavljala je dokaz prisustva antigena  
45 EHV-1 ili EHV-4 u ispitivanom materijalu.

46 Preduslov za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i Nested multiplex  
47 PCR je ekstrakcija nukleinske kiseline virusa koja je izvršena prema uputstvu proizvođača  
48 kita za ekstrakciju DNK GeneJet Genomic DNA Purification Kit proizvođača Thermo  
49 Scientific, SAD. Metoda Nested multiplex PCR korišćena je za identifikaciju izolovanih virusa,  
50 kao i za direktno ispitivanje prisustva nukleinskih kiselina EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u  
51 uzorcima nosnih briseva i organa konja. U cilju identifikacije izolovanih virusa primenom  
52 metode Nested multiplex PCR izvršena je ponovna inokulacija uzoraka poreklom iz organa i  
53 nosnih briseva konja u ćelijske linije RK-13. Kandidat je dodatnu identifikaciju sojeva EHV-1  
54 vršio primenom PCR sa prajmerima specifičnim za delove gena ORF30 i ORF68 navedenog  
55 virusa, a dobijeni PCR produkti su zatim sekvencirani metodom po Sanger-u.

56 Metoda Nested multiplex PCR se izvodi u dve faze i iz navedenog razloga su  
57 pripremane dve reakcione smeše sa različitim parovima prajmera. U prvoj fazi su kao  
58 ispitivani uzorci korišćeni pripremljeni DNK ekstrakti, dok su u drugoj fazi uzorke predstavljali  
59 PCR produkti iz prve faze. Korišćen je isti protokol za obe faze Nested multiplex PCR sa  
60 prajmerima za deo gena koji kodira glikoprotein B (gB) EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5:

1 inicijalna denaturacija na 94°C tokom 5 minuta, 30 ciklusa denaturacije na 94°C (1 minut),  
2 hibridizacije prajmera na 60°C tokom 1 minut, ekstenzije na 72°C tokom 1 minuta i finalna  
3 ekstenzija u trajanju od 7 minuta na 72°C. Rezultati Nested multiplex PCR su očitavani  
4 primenom elektroforeze u agaroznom gelu, a prisustvo fragmenata gB gena veličina 188bp,  
5 677bp, 817bp i 410bp smatrano je pozitivnim nalazom EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5.

6 Ekstrakti DNK kod kojih je utvrđeno prisustvo EHV-1 kao i ekstrakti DNK arhiviranih  
7 sojeva EHV-1 su ispitivani primenom dva različita PCR protokola sa parovima prajmera koji  
8 amplifikuju delove gena ORF30 i ORF68 navedenog virusa.

9 Lančana reakcija polimeraze u cilju amplifikacije dela ORF30 gena EHV-1 izvedena  
10 je prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 15 minuta na 95°C, zatim  
11 34 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 1 minut, hibridizacije prajmera na 55,5°C (1  
12 minut), ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 minut, kao i finalne ekstenzije u trajanju od 10  
13 minuta na 72°C. Prisustvo PCR produkta veličine 466bp smatrano je pozitivnim nalazom.

14 Izvođenje PCR u cilju amplifikacije dela gena ORF68 EHV-1 vršeno je prema  
15 termalnom protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C tokom 3 minuta, 30 ciklusa denaturacije  
16 na 94°C (30 sekundi), hibridizacije prajmera na 50°C tokom 1 minut, ekstenzije na 72°C tokom  
17 1 minuta i finalna ekstenzija u trajanju od 6 minuta na 72°C. Analizom rezultata primenom  
18 elektroforeze u agaroznom gelu pozitivnim nalazom smatrano je prisustvo PCR produkata  
19 veličine od oko 600bp. U cilju pripreme umnoženog dela gena ORF68 konjskog herpesvirusa  
20 1 za sekvenciranje, odgovarajući fragmenti su posle elektroforeze isecani iz agaroznog gela,  
21 a DNK je prečišćavana pomoću kita PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Velika  
22 Britanija) prema uputstvu proizvođača.

23 U cilju izvođenja metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u, dobijeni PCR produkti  
24 su prečišćavani primenom Mini Elute PCR purification kit (Qiagen, SAD) prema proceduri  
25 propisanoj od strane proizvođača. Prečišćeni PCR produkti su zatim korišćeni za pripremanje  
26 mešavine za izvođenje metode PCR (cycle sequencing) po sledećem protokolu: denaturacija  
27 na 96°C u trajanju od 2 minuta, 40 ciklusa denaturacije na temperaturi od 96°C u trajanju od  
28 10 sekundi, vezivanja prajmera na 50°C tokom 5 sekundi i elongacije na temperaturi od 60°C  
29 u vremenskom periodu od 4 minuta. Dobijeni PCR produkti su zatim tretirani izopropanolom,  
30 denaturisani primenom formamida i sekvencirani u sekvenceru ABI PRISM Genetic Analyzer  
31 310 (Applied Biosystems, SAD). Jedan deo uzoraka je poslat na uslužno sekvenciranje u  
32 MacroGen Europe Laboratory, Amsterdam, Holandija.

33 Primenom metode direktnog sekvenciranja vršeno je određivanje redosleda  
34 nukleotida dela gB gena EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5, zatim dela ORF30 gena EHV-1 i  
35 dela ORF68 regiona genoma EHV-1. Po završenom izvođenju postupka direktnog  
36 sekvenciranja po Sanger-u, molekularna i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci  
37 izvršena je u programskom paketu MEGA verzija 7.0. Upotrebom BLAST programa (eng.  
38 Basic Local Alignment Search Tool), dobijene sekvence su poređene sa sekvencama  
39 odgovarajućih regiona genoma EHV-1, EHV-2, EHV-4 i EHV-5 dostupnim u GenBank bazi  
40 podataka, odnosno, NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Institutes  
41 of Health) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) u cilju utvrđivanja sličnosti ili razlika između njih.  
42 Određivanje redosleda nukleotida u regionima ORF30 i ORF68 genoma EHV-1 i njihovo  
43 poređenje sa odgovarajućim referentnim sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka  
44 vršeno je primenom programa BioEdit 7.2.5., dok je filogenetska analiza dobijenih sekvenci  
45 izvršena primenom kompjuterskog programa MEGA 7 na osnovu automatski kreiranog stabla  
46 pomoću ML (eng. Maximum Likelihood) metode.

47 U poglavlju **Rezultati ispitivanja** kandidat je detaljno prikazao rezultate identifikacije i  
48 molekularne karakterizacije konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 sa teritorije Republike Srbije i  
49 Republike Srpske kao i arhiviranih izolata EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta  
50 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

51 Primenom metode izolacije virusa na kulturi tkiva kojom je obuhvaćeno ukupno 217  
52 uzoraka ispitivanog materijala, pojava karakterističnog citopatogenog efekta je utvrđena posle  
53 inokulacije 84 uzorka (38,71%), od kojih je 51 uzorak bio poreklom iz organa, 28 poreklom iz  
54 nosnih briseva konja, a preostalih su 5 predstavljali arhivirane sojeve EHV-1 Katedre za  
55 mikrobiologiju.

56 U testu virus neutralizacije (VN test) prisustvo EHV-1 i EHV-4 potvrđeno je u 47  
57 uzoraka organa (92,16%), dok su rezultati VN testa za preostala četiri uzorka bili negativni.  
58 Primenom VN testa prisustvo EHV-1 i EHV-4 potvrđeno je kod ćelijskih linija pojedinačno  
59 inokulisanih sa 25 uzoraka nosnih briseva konja (89,29%), dok kod tri preostala uzorka nije  
60 ustanovljeno prisustvo navedenih virusa. Identifikacija svih pet uzoraka arhiviranih sojeva

1 EHV-1 Katedre za mikrobiologiju je potvrđena primenom izolacije virusa na kulturi tkiva i  
2 testom virus neutralizacije.

3 Primenom metode direktne imunofluorescencije, prisustvo antigena virusa EHV-  
4 1/EHV-4 potvrđeno je ispitivanjem ćelijskih linija RK-13 pojedinačno inokulisanih sa 72 uzorka  
5 izolovanih virusa prethodno identifikovanih primenom VN testa. Kod ćelijskih linija  
6 pojedinačno inokulisanih uzorcima preostalih 7 izolata (4 izolata iz organa i 3 izolata iz nosnih  
7 briseva) nije ustanovljeno postojanje fluorescencije, dok je kod ćelijskih linija inokulisanih  
8 uzorcima 5 arhiviranih sojeva EHV-1 utvrđena jasno izražena specifična fluorescencija u jedru  
9 i citoplazmi ćelija kulture tkiva.

10 Od ukupno 212 ispitivanih uzoraka organa i nosnih briseva konja, primenom metode  
11 izolacije virusa na kulturi ćelija RK-13 sa identifikacijom izolata primenom Nested multiplex  
12 PCR izolacija virusa je bila uspešna iz 79 uzoraka (37,26%). Primenom metode Nested  
13 multiplex PCR je izvršena diferencijacija EHV-1 i EHV-4 koja nije bila moguća metodom  
14 imunofluorescencije i VN testom s obzirom da se za njihovo izvođenje upotrebljavaju  
15 poliklonski imuni serum. Pored toga, primenom navedene molekularne metode bila je  
16 omogućena i detekcija konjskog herpesvirusa 5 i to u ispitivanim uzorcima koji su bili  
17 negativni posle izvođenja VN testa i direktne imunofluorescencije. Posle izvođenja Nested  
18 multiplex PCR izvršena je identifikacija ukupno 47 izolata virusa poreklom iz organa konja,  
19 odnosno 25 izolata poreklom iz nosnih briseva konja koji su prethodno bili pozitivni primenom  
20 VN testa i metode imunofluorescencije. U svim navedenim uzorcima (ukupno 72) dokazano je  
21 prisustvo nukleinske kiseline EHV-1. U ukupno 7 izolata, tj. 4 izolata poreklom iz organa konja  
22 i 3 izolata poreklom iz nosnih briseva konja detektovana je nukleinska kiselina konjskog  
23 herpesvirusa 5, dok prisustvo konjskog herpesvirusa 4 i konjskog herpesvirusa 2 nije  
24 utvrđeno ni u jednom od navedenih uzoraka.

25 Primenom metode Nested multiplex PCR za ispitivanje prisustva nukleinskih kiselina  
26 konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 direktno u uzorcima ispitivanog materijala (organa i nosnih  
27 briseva konja) detektovano je ukupno 162 uzorka (86 uzoraka organa i 76 uzoraka nosnih  
28 briseva) pozitivnih na prisustvo jednog ili više konjskih herpesvirusa (76,42%). Od ukupnog  
29 broja pozitivnih uzoraka mešovite infekcije sa dva ili više konjska herpesvirusa utvrđene su u  
30 16,67% uzoraka, pri čemu su EHV-2 i EHV-4 identifikovani isključivo u okviru mešovite  
31 infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5. U svim pozitivnim uzorcima organa detektovana je nukleinska  
32 kiselina konjskog herpesvirusa 1 (100%), dok su svi ostali virusi bili prisutni u okviru mešovite  
33 infekcija sa EHV-1 i to: EHV-4 u 10 (11,63%), EHV-2 u 4 (4,65%) i EHV-5 u 7 (8,14%)  
34 uzoraka. U nosnim brisevima poreklom od konja sa teritorije Republike Srbije otkriveno je  
35 prisustvo konjskih herpesvirusa 1 i 4 u 24 uzorka, pri čemu je EHV-4 bio prisutan u okviru  
36 mešovite infekcije u nosnom brisu poreklom od jednog konja. Ukupno 52 uzorka nosnih  
37 briseva konja poreklom iz Republike Srpske bilo je pozitivno na prisustvo nukleinskih kiselina  
38 konjskih herpesvirusa 1 i 5 pri čemu je nukleinska kiselina EHV-5 detektovana u ukupno 16  
39 uzoraka. Postojanje mešovite infekcije sa pomenuta dva virusa utvrđeno je kod ukupno 7  
40 ispitivanih uzoraka. Primenom metode Nested multiplex PCR prisustvo nukleinske kiseline  
41 EHV-1 je dokazano kod ukupno 153 uzoraka organa i nosnih briseva konja, nukleinska  
42 kiselina konjskog herpesvirusa 4 je detektovana kod ukupno 11 uzoraka (10 uzoraka organa i  
43 1 uzorak nosnog brisa), prisustvo EHV-2 je utvrđeno u ukupno 4 uzorka organa poreklom od  
44 jednog ždrebeta, a nukleinska kiselina EHV-5 detektovana je u ukupno 23 uzorka organa i  
45 nosnih briseva konja.

46 Metodnom direktnog sekvenciranja po Sanger-u dobijene su sekvence delova gB gena  
47 odabranih identifikovanih sojeva virusa sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske.  
48 Analizirane su sekvence delova gB gena ukupno 10 sojeva EHV-1, 1 soja EHV-4, jednog soja  
49 EHV-2 i 7 sojeva EHV-5.

50 Međusobna nukleotidna homologija sekvenci dela gB gena sojeva EHV-1 kao i  
51 homologija sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do  
52 100%, dok je nukleotidna homologija sekvence dela gB gena soja EHV-4 sa sekvencama  
53 sojeva navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila 99%. Pored toga, utvrđena je i  
54 nukleotidna homologija sekvence dela gB gena soja EHV-2 sa sojevima navedenog virusa iz  
55 međunarodne banke gena koja je iznosila od 80 do 99%. Međusobna nukleotidna homologija  
56 sekvenci dela gB gena sojeva EHV-5 kao i homologija sa sekvencama sojeva navedenog  
57 virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%.

58 Analizom filogenetskog stabla sastavljenog poređenjem sekvenci delova gB gena  
59 odabranih identifikovanih sojeva konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz Republike Srbije i  
60 Republike Srpske sa sekvencama navedenog gena EHV-1 iz međunarodne banke gena

1 ustanovljeno je grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske, Velike Britanije, SAD i Japana. Na  
2 filogenetskom stablu koje je sastavljeno na osnovu dela gB gena konjskog herpesvirusa 4 soj  
3 EHV-4 poreklom iz Republike Srbije je grupisan sa turskim sojevima navedenog virusa, a  
4 odvojeno od sojeva iz Irske i Japana. Na filogenetskom stablu formiranom na osnovu  
5 poređenja nukleotidnih sekvenci dela gB gena soja konjskog herpesvirusa 2 poreklom iz  
6 Republike Srbije sa sekvencama sojeva iz međunarodne banke gena zapaža se grupisanje  
7 sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike Britanije, dok su sojevi iz drugih evropskih zemalja  
8 (Mađarska, Nemačka, Švedska) odvojeni od navedene grupe. Uvidom u filogenetsko stablo  
9 sastavljeno na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci delova gB gena odabranih sojeva  
10 konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama  
11 navedenog gena EHV-5 iz međunarodne banke gena utvrđeno je grupisanje sa sojevima  
12 poreklom iz Turske i SAD.

13 Deo ORF30 gena konjskog herpesvirusa 1 identifikovan je primenom PCR u ukupno  
14 15 odabranih uzoraka u kojima je prethodno metodom Nested multiplex PCR utvrđeno  
15 prisustvo EHV-1. Sekvenciranjem 15 odabranih PCR produkata uspešno je dobijeno 12  
16 sekvenci dela ORF30 gena sojeva EHV-1. Sekvence delova gena ORF30 sojeva EHV-1  
17 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske su primenom programa BioEdit 7.2.5  
18 poređene sa odgovarajućim referentnim sekvencama sojeva konjskog herpesvirusa 1  
19 preuzetim iz GenBank baze podataka. Nukleotidne sekvence dela gena ORF30 analiziranih  
20 11 sojeva (91,67%) u ovoj studiji su posedovale neurovirulentni genetski marker (G<sub>2254</sub>) usled  
21 supstitucije adenina guaninom na poziciji 2254. Među identifikovanim neurovirulentnim  
22 sojevima EHV-1 bila su i četiri arhivirana soja EHV-1 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju.

23 Deo ORF68 gena konjskog herpesvirusa 1 identifikovan je primenom PCR u ukupno  
24 15 odabranih uzoraka u kojima je prethodno metodom Nested multiplex PCR utvrđeno  
25 prisustvo EHV-1. Sekvence delova gena ORF68 svih 15 sojeva EHV-1 poreklom iz Republike  
26 Srbije i Republike Srpske su primenom programa BioEdit 7.2.5 poređene sa odgovarajućim  
27 referentnim sekvencama sojeva konjskog herpesvirusa 1 preuzetim iz GenBank baze  
28 podataka, odnosno sa predstavnicima 10 geografskih grupa. Sekvence delova ORF68 gena 2  
29 arhivirana izolata Katedre za mikrobiologiju su posedovale mutacije na nivou pojedinačnih  
30 nukleotida karakteristične za sojeve EHV-1 iz četvrte geografske grupe koja obuhvata  
31 evropske sojeve EHV-1. Ostale dobijene sekvence sojeva EHV-1 (ukupno 13) su posedovale  
32 preveliki broj mutacija na osnovu čije analize se nisu mogle svrstati ni u jednu geografsku  
33 grupu. Na osnovu dobijenih sekvenci dela gena ORF68, formirano je filogenetsko stablo.

34 U poglavlju **Diskusija** kandidat je rezultate svojih ispitivanja upoređivao sa  
35 rezultatima sličnih studija stranih autora.

36 U poglavlju **Spisak literature** autor je naveo spisak od 302 rada domaćih i stranih  
37 autora koji obrađuju tematiku vezanu za ovu doktorsku disertaciju.

## 38 39 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 40 disertaciji):

41 Na osnovu rezultata dobijenih identifikacijom i molekularnom karakterizacijom sojeva  
42 konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 sa teritorija Republike Srbije i Republike Srpske, kao i  
43 arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju, izvedeni su sledeći zaključci:

44  
45 1. Metodom izolacije i identifikacije virusa na kulturi tkiva primenom testa virus  
46 neutralizacije, direktne imunofluorescencije i metode Nested multiplex PCR od ukupno 212  
47 ispitivanih uzoraka organa i nosnih briseva konja prisustvo konjskog herpesvirusa 1 je  
48 utvrđeno u 72 uzorka, dok je metodom izolacije virusa na kulturi ćelija sa identifikacijom  
49 primenom metode Nested multiplex PCR iz prethodno navedenih uzoraka konjski herpesvirus  
50 5 detektovan u 7 uzoraka, a konjski herpesvirusi 4 i 2 nisu izolovani ni iz jednog uzorka  
51 nosnih briseva i organa konja.

52 2. Prisustvo nukleinskih kiselina EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 je utvrđeno u ukupno  
53 162 ispitana uzorka nosnih briseva i organa konja pri čemu je EHV-1 detektovan u 153  
54 uzorka, EHV-4 u 11, EHV-2 u 4, a EHV-5 u 23 uzorka ispitivanog materijala.

55 3. Metodom Nested multiplex PCR je ustanovljeno prisustvo mešovitih infekcija sa  
56 dva ili više konjska herpesvirusa u 16,67% od ukupnog broja pozitivnih uzoraka, pri čemu su  
57 EHV-2 i EHV-4 identifikovani isključivo u okviru mešovitih infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5.

58 4. Metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru dobijeno je ukupno 10 sekvenci  
59 delova gB gena EHV-1, jedna sekvenca dela gB gena EHV-4, jedna sekvenca dela gB gena



1 EHV-2 i 7 sekvenci delova gB gena EHV-5, 12 sekvenci dela gena ORF30 EHV-1 i 2  
2 sekvence dela gena ORF68 EHV-1.

3 5. Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih  
4 sojeva EHV-1 kao i homologija njihovih sekvenci sa sekvencama sojeva navedenog virusa iz  
5 međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%, dok je analizom filogenetskog stabla  
6 sastavljenog poređenjem sekvenci delova gB gena odabranih sojeva konjskog herpesvirusa 1  
7 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama navednog gena EHV-1 iz  
8 međunarodne banke gena ustanovljeno njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske,  
9 Velike Britanije, SAD i Japana.

10 6. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-4 sa  
11 sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je 99%, a na filogenetskom  
12 stablu sastavljenom na osnovu dela gB gena konjskog herpesvirusa 4, soj EHV-4 poreklom iz  
13 Republike Srbije grupisan je sa turskim sojevima navedenog virusa i odvojeno od sojeva iz  
14 Evrope i Japana.

15 7. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-2 sa  
16 sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 80 do 99%, dok je na  
17 filogenetskom stablu formiranom na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci dela gB gena  
18 soja konjskog herpesvirusa 2 poreklom iz Republike Srbije sa sekvencama sojeva iz  
19 međunarodne banke gena utvrđeno njegovo grupisanje sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike  
20 Britanije, pri čemu su sojevi iz drugih evropskih zemalja (Mađarska, Nemačka, Švedska) bili  
21 odvojeni od navedene grupe.

22 8. Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih  
23 sojeva EHV-5 kao i njihova sličnost sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke  
24 gena iznosila je od 98 do 100%, a na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci delova gB  
25 gena odabranih sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i  
26 Republike Srpske sa sekvencama sojeva EHV-5 iz međunarodne banke gena ustanovljeno je  
27 njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske i SAD.

28 9. Sekvence dela gena ORF30 11 analiziranih sojeva EHV-1 (91,67%) su posedovale  
29 neurovirulentni genetski marker (G<sub>2254</sub>) što je posledica supstitucije adenina guaninom na  
30 poziciji 2254, pri čemu su među identifikovanim neurovirulentnim sojevima EHV-1 bila i četiri  
31 arhivirana soja EHV-1 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju.

32 10. U sekvencama delova ORF68 gena arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za  
33 mikrobiologiju utvrđene su mutacije na nivou pojedinačnih nukleotida karakteristične za  
34 sojeve EHV-1 koji pripadaju četvrtoj geografskoj grupi, odnosno evropskim sojevima  
35 pomenutog virusa, dok je kod ostalih dobijenih sekvenci ustanovljen veliki broj mutacija na  
36 osnovu čije analize se isti nisu mogli svrstati ni u jednu geografsku grupu što ukazuje da  
37 ORF68 ne predstavlja pogodan molekularni marker za proučavanje sojeva EHV-1 sa ovih  
38 prostora.

## 40 VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li 41 su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li 42 zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):

43 Svi dobijeni rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji doktora veterinarske medicine  
44 Andree Radalj pod naslovom „Identifikacija i molekularna karakterizacija herpesvirusa konja“  
45 su u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, a svi izvedeni zaključci proizilaze iz  
46 dobijenih rezultata.

## 48 VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:

### 50 1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?

51 Doktorska disertacija doktora veterinarske medicine Andree Radalj je napisana u  
52 skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

### 53 2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?

54 Doktorska disertacija dr. vet. med. Andree Radalj sadrži sve neophodne elemente  
55 propisane za završenu doktorsku disertaciju.

### 56 3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?

57 Ispitivanja koja su bila predmet ove doktorske disertacije imala su za cilj identifikaciju  
58 i molekularnu karakterizaciju konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 sa teritorije Republike Srbije i  
59 Republike Srpske kao i arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta  
60 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Dobijeni rezultati prikazani u okviru ove

1 doktorske disertacije pružili su podatke o prisustvu navedenih herpesvirusa kod konja na  
2 području Republike Srbije i Republike Srpske kao i molekularnim karakteristikama njihovih  
3 genoma uključujući i arhivirane sojeve EHV-1 što do sada nije bilo dostupno naučnoj javnosti.  
4 Delovi nukleotidnih sekvenci izolovanih i/ili identifikovanih herpesvirusa konja utvrđeni  
5 primenom molekularnih metoda su upoređivani sa analognim nukleotidnim sekvencama  
6 sojeva EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 izolovanih širom sveta u cilju proučavanja sličnosti i  
7 razlika između njih što doprinosi sticanju kompletnijeg uvida u epizootiološku situaciju na  
8 terenu. Ispitivanjem genoma identifikovanih sojeva konjskog herpesvirusa 1 sa teritorije  
9 Republike Srbije i Republike Srpske ustanovljeno je prisustvo i neurovirulentnih sojeva  
10 pomenutog patogena. Pored toga utvrđena je pripadnost arhiviranih izolata EHV-1 evropskim  
11 sojevima pomenutog virusa, pri čemu je utvrđeno da se deo ORF68 gena sojeva EHV-1 iz  
12 Republike Srbije i Republike Srpske odlikuje izraženim genetskim polimorfizmom i iz  
13 navedenog razloga ne predstavlja pogodan molekularni marker za izučavanje domaćih sojeva  
14 konjskog herpesvirusa 1. Rezultati dobijeni tokom izrade doktorske disertacije su potvrdili  
15 opravdanost primene klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike sa ciljem brze i  
16 pouzdane dijagnostike herpesvirusnih infekcija konja, što predstavlja osnovu za preduzimanje  
17 adekvatnih mera kontrole navedenih oboljenja.

## 18 19 **IX PREDLOG:**

20  
21 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**  
22 **ponuđenih mogućnosti):**

23 Na osnovu ukupne ocene doktorske disertacije dr. vet. med. Andree Radalj, komisija  
24 predlaže da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana.

25  
26 **DATUM**

27  
28 27.04.2018.

**POTPISI ČLANOVA KOMISIJE**

29  
30  
31  
32  
33 \_\_\_\_\_  
34 Dr Nenad Milić, red. prof.  
35 Fakultet veterinarske medicine  
36 Univerziteta u Beogradu

37  
38 \_\_\_\_\_  
39 Dr Jakov Nišavić, van. prof.  
40 Fakultet veterinarske medicine  
41 Univerziteta u Beogradu

42  
43 \_\_\_\_\_  
44 Dr Dejan Krnjaić, red. prof.  
45 Fakultet veterinarske medicine  
46 Univerziteta u Beogradu

47  
48 \_\_\_\_\_  
49 Dr Miroslav Valčić, red. prof.  
50 Fakultet veterinarske medicine  
51 Univerziteta u Beogradu

52  
53 \_\_\_\_\_  
54 Dr Tanja Jovanović, red. prof.  
55 Medicinski fakultet  
Univerziteta u Beogradu