

3
4
5
6 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**
7

8
9 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

10
11 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

12 Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду на 204
13 седници одржаној 18.03.2020. године.

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

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

20 1. др Соња Обреновић, ванредни професор, Епизоотиологија, заразне болести животиња и
21 болести пчела и свилопреља, 2017, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
22 (Ментор 1).

23 2. др Дејан Видановић, виши научни сарадник, Микробиологија са имунологијом, 2018,
24 Ветеринарски специјалистички институт "Краљево" (Ментор 2).

25 3. др Драган Баџић, ванредни професор, 2016, Епизоотиологија, заразне болести животиња и
26 болести пчела и свилопреља, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

27 4. др Јаков Нишавић, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2020, Факултет
28 ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

29 5. др Тамаш Петровић, научни саветник, 2016, Микробиологија и инфективне болести, Научни
30 институт за ветеринарство „Нови Сад“, у Новом Саду

31
32 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

33
34 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Марија, Драган, Манић

35
36 2. **Датум рођења, општина, Република:** 18.12.1986. године, Врање, Република Србија

37
38 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**

39
40 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

41
42 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

43
44 „Примена молекуларних метода у дијагностици болести квргаве коже говеда на
45 територији Републике Србије и њихов значај у процени епизоотиолошке ситуације“

46
47 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика, шема,**
48 **графика и сл.):**

49 Докторска дисертација је написана на 110 страна компјутерски обрађеног текста и садржи
50 следећа поглавља: Увод (2 стране), Преглед литературе (15 страна), Циљеви и задаци (1
51 страна), Материјал и методе (18 страна), Резултати (35 страна), Дискусија (10 страна),
52 Закључци (2 стране), Литература (11 страна).

53 На почетку дисертације налази се кратак садржај на српском и енглеском језику. На крају
54 дисертације се налазе Листа скраћеница, Прилог, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности
55 штампане и електронске верзије рада, Изјава о коришћењу и Биографија кандидата.

56 Рад је документован са 68 табела, 3 графика и 14 слика.

57 Списак литературе обухвата 156 библиографских јединица, од којих су 37 објављене у
58 последње три године.

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

6 У **Уводу** кандидат наводи да је болест квргаве коже (БКК) економски значајно заразно
7 обољење говеда и даје основне податке о таксономији узрочника, путевима преношења вируса
8 и клиничкој слици болести. Наводи да се дијагностика БКК заснива на праћењу
9 епизоотиолошке ситуације, препознавању карактеристичних клиничких симптома болести, а
10 потврђује применом класичних и молекуларних метода лабораторијске дијагностике. Кандидат
11 посебно истиче значај примене молекуларних метода дијагностике које се заснивају на
12 ланчаној реакцији полимеразе (*PCR*) због велике осетљивости, релативно брзог извођења,
13 могућности анализе великог броја узорака, употреби добијених резултата у молекуларној
14 епизоотиологији, као и испитивању узорака који нису адекватни за извођење методе изолације
15 вируса. У овом поглављу кандидат наводи да је појава епизоотије БКК на подручју Европе,
16 поред других мера у контроли и сузбијању болести, обухватала и масовну вакцинацију
17 пријемчивих животиња што је имало за последицу појаву поствакциналних реакција код
18 вакцинисаних животиња. Поред тога, кандидат истиче значај константног праћења
19 епизоотиолошке ситуације у циљу ефикасног и брзо спровођење мера контроле и сузбијања
20 болести.

21 Поглавље **Преглед литературе** кандидат започиње историјским подацима о првом опису
22 болести квргаве коже говеда у Замбији 1929. године. У оквиру потпоглавља Етиологија посебна
23 пажња је посвећена карактеристикама вируса припадника рода *Capripoxvirus* (*CaPV*). У
24 посебном потпоглављу кандидат наводи детаљне податке о географској раширености БКК,
25 ширењу болести са афричког континента на подручје Блиског Истока и Европе и првој појави
26 болести у Републици Србији у јуну месецу 2016. године. У наредном потпоглављу кандидат
27 описује епизоотиолошке карактеристике БКК, где наводи природне домаћине, утицај старости,
28 пола и расе говеда на испољавање клиничких симптома болести, као и утицај климатских
29 фактора, надморске висине, начина држања говеда, имунског статуса животиња и брзине
30 спровођења мера контроле и сузбијања на брзину ширења епизоотије БКК. Кандидат посебан
31 нагласак ставља на улогу различитих врста хематофагних инсеката у преношењу вируса
32 болести квргаве коже, а наводи да је могућ пренос вируса и преко контаминираних хране и воде,
33 вештачког осемењавања, интраутериним путем и јатрогено. У наредним потпоглављима
34 кандидат укратко описује патогенезу, клиничку слику, имунски одговор и патоморфолошки
35 налаз код БКК. У потпоглављу Дијагностика кандидат описује карактеристике доступних
36 лабораторијских метода, од изолације вируса на култури ћелија, секвенцирања делова генома
37 вируса, молекуларних и серолошких метода дијагностике. Сходно циљевима и задацима
38 докторске дисертације, кандидат је посебну пажњу посветио детекцији генома вируса БКК
39 применом молекуларних метода (*PCR* и *real-time PCR*) наводећи да током епизоотије БКК на
40 подручју Европе, применом молекуларних метода препоручених од стране Светске
41 организације за здравље животиња (ОИЕ), и то конвенционалног *PCR* (Ireland и Vineral, 1998),
42 као и протокола за извођење *real-time PCR* (Bowden и сар, 2008; Balinsky и сар, 2008) није било
43 могуће разликовати вирусе унутар рода *capripoxvirus*, као ни вакциналне од теренских сојева
44 вируса болести квргаве коже. Кандидат даље наводи да су у међувремену развијени *real-time*
45 *PCR* протоколи који су осетљивији, специфичнији и лакши за извођење и тумачење резултата.
46 Поред навођења већине тренутно доступних *PCR* протокола кандидат истиче значај *real-time*
47 *PCR* протокола *KV-2* који је специфичан само за теренске сојеве вируса и који се поред
48 протокола према Bowden и сар, (2008) користио у дијагностици БКК у Републици Србији, али и
49 земљама у региону. Такође, истиче да је један од најзначајнијих проблема са којима се сусрећу
50 земље у којима се спроводи вакцинација против БКК, имајући у виду могућност појаве
51 поствакциналних реакција, непостојање валидованих *real-time PCR* протокола којима је могуће
52 разликовање вакциналних од теренских сојева вируса БКК у испитујућим узорцима. У посебном
53 потпоглављу наведене су мере контроле и сузбијања БКК а које обухватају: забрану кретања
54 животиња, контролу вектора, *stamping out* оболелих и на обољење сумњивих животиња, као и
55 спровођење вакцинације целокупне популације пријемчивих животиња као најзначајнији начин
56 контроле болест у земљама где се БКК јавља ензоотски.

57 **Циљеви и задаци** истраживања су обухватили изолацију и идентификацију вируса БКК,
58 секвенцирање дела генома идентификованих и изолованих вируса БКК и молекуларно
59 епизоотиолошку анализу добијених података, као и епизоотиолошку анализу епизоотије БКК на

1 эпизоотолошком подручју Ветеринарског специјалистичког института Ниш (ВСИ Ниш). С
2 обзиром на велики значај молекуларних метода у раној дијагностици БКК и проблем у
3 разликовању вакциналног од теренског соја вируса БКК циљ је био и испитивање сопствено
4 припремљеног *real-time PCR* протокола за доказивање теренског соја вируса, упоређивање са
5 већ доступним, и дефинисање најпоузданијег (најспецифичнијег и најосетљивијег) протокола за
6 доказивање присуства вируса БКК. Циљ ове докторске дисертације је био и припрема и
7 валидација *real-time PCR* протокола за детекцију вакциналног соја вируса БКК у клиничким
8 узорцима који би омогућили разликовање вакциналног од теренских сојева вируса.
9 Имајући у виду наведене циљеве постављени су следећи задаци:

- 10 1. Прикупљање и систематизација эпизоотолошких података на локалитетима избијања БКК
11 на эпизоотолошком подручју ВСИ „Ниш“.
- 12 2. Прикупљање узорака (пуна крв, биоптати коже и носни брисеви) од невакцинисаних говеда
13 са клиничким симптомима болести.
- 14 3. Прикупљање узорака (пуна крв, биоптати коже и носни брисеви) од вакцинисаних говеда
15 са клиничким симптомима.
- 16 4. Изолација вируса БКК из клиничких узорака на култури ћелија, утврђивање титра
17 изолованог вируса и његова идентификација применом методе ланчане реакције
18 полимеразе (*PCR*) и реакцијом вирус неутрализације (ВНТ).
- 19 5. Испитивање присуства генома вируса БКК у прикупљеним узорцима применом протокола
20 за извођење методе *real-time PCR* и *nested PCR* уз коришћење одговарајућих
21 олигонуклеотидних прајмера и проба.
- 22 6. Утврђивање редоследа нуклеотида у делу генома детектованих и изолованих вируса БКК
23 применом методе директног секвенцирања.
- 24 7. Упоредивање секвенци изолованих и идентификованих вируса БКК из узорака говеда
25 пореклом са територије Р. Србије са нуклеотидним секвенцама референтних сојева и
26 изолата вируса из других делова света које се налазе у међународној бази података -
27 банци гена (*NCBI GenBank*) у циљу утврђивања порекла вируса код говеда на подручју
28 Републике Србије.
- 29 8. Припрема и валидација новог *real-time PCR* протокола за детекцију теренског соја вируса
30 БКК.
- 31 9. Припрема и валидација новог *real-time PCR* протокола за детекцију вакциналног соја
32 вируса БКК
- 33 10. Испитивање присуства генома вакциналног соја вируса у узорцима пореклом од
34 вакцинисаних говеда сопствено припремљеним *real-time PCR* протоколом.
- 35 11. Израда эпизоотолошке карте, мапирање эпизоотије са утврђеном преваленцијом
36 оболонења и испитивање учесталости клиничких симптома код говеда после вакцинације, на
37 эпизоотолошком подручју ВСИ „Ниш“.

38 У поглављу **Материјал и методе** испитивања кандидат је кроз одговарајућа потпоглавља
39 детаљно описао материјал и методе које је користио током израде докторске дисертације.

40 Сви узорци коришћени у испитивању потицали су са эпизоотолошког подручја ВСИ Ниш и
41 сакупљени су током эпизоотије БКК 2016. године. Изолација вируса БКК је рађена из узорака
42 биоптата коже десет говеда са клиничким симптомима болести у којима је методом *real-time*
43 *PCR* утврђено присуство генома вируса БКК. Метода изолације вируса изведена је тако што су
44 претходно обрађени узорци биоптата коже инокулисани у удубљења микротитар плоча са
45 равним дном са по 6 базенчића (*Sarstedt*, Немачка) у којима је претходно умножена ћелијска
46 линија *Madin Darby bovine kidney (MDBK) (ATCC-CCL22) (LGC Standards*, Енглеска). Као
47 позитивна контрола коришћен је сој *Serbia/Bujanovac/2016* (власништво Научног института за
48 ветеринарство „Нови Сад“) који је инокулисан у дупликату у удубљења микротитар плоче, док
49 су два неинокулисана удубљења служила као негативна контрола. После инкубације
50 инокулисаних ћелијских линија на температури од 37°C у трајању од 60 минута додата је
51 подлога за одржавање MEM (*Sigma*, САД) са 10% феталног говеђег серума (*Capricorn Scientific*,
52 Немачка) и мешавином антибиотика и антимицотика (*Sigma*, САД). Инокулисане ћелијске
53 линије су инкубирани на температури од 37°C током 7 дана (*Memmert*, Немачка) и свакодневно
54 контролисане микроскопски (*Olympus*, Јапан) на присуство цитопатогеног ефекта (ЦПЕ). После
55 појаве ЦПЕ који је захватио око 50% ћелија, инкубација је прекидана и материјал са умноженим
56 вирусом је замрзаван. После 7 дана, све ћелије са инокулисаним узорцима у којима није дошло
57 до појаве ЦПЕ су замрзаване и одмрзаване три пута, и нове ћелијске линије су на претходно
58 описан начин инокулисане материјалом из прве пасаже. Узорци испитиваног материјала после
59 чије инокулације није дошло до појаве ЦПЕ после треће пасаже проглашавани су негативним

1 на присуство вируса. Доказивање присуства вируса БКК у инокулисаним ћелијским линијама је
2 вршено применом молекуларних метода (*real-time PCR*) и теста вирус неутрализације (ВНТ).

3 Одређивање титра изолованог вируса је урађено на култури ћелија *MDBK* у микротитар
4 плочама са 96 базенчића (*Sarstedt*, Немачка). Титар изолованог вируса је одређиван тако што
5 је супернатант културе ткива са инокулисаним узорком који је довео до ЦПЕ титриран у
6 десетоструким разређњима од 10^{-1} до 10^{-8} направљених у подлози за раст и одржавање ћелија
7 МЕМ (*Sigma*, САД) и инкубиран на температури од 37°C у трајању од 5 дана уз свакодневну
8 контролу појаве ЦПЕ. Титар вируса је израчунаван методом по Reed и Muench (1938).

9 За извођење ВНТ као позитивна контрола коришћен је збирни узорак крвних серума неколико
10 говеда вакцинисаних атенуираном вакцином *Neethling live attenuated vaccine (Onderstepoort*,
11 Јужна Африка) против БКК, којима је крв узоркована 28. дана након вакцинације и који је
12 претходно испитан комерцијалним *ELISA* китом на присуство специфичних антитела против
13 вируса БКК (*ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species, IDvet*, Француска). Као негативна
14 контрола коришћен је фетални говеђи серум (*Capricorn Scientific*, Немачка, лот: *CP16-1377*).
15 Комплемент у крвном серуму је инактивисан на 56°C у трајању од 30 минута. Вирус
16 неутрализациони тест је изведен тако што су у микротитар плочи за културу ткива са 96
17 базенчића направљена двострука серијска разређења (од 1:2 до 1:256) позитивног и негативног
18 крвног серума помоћу МЕМ подлоге, без додатка феталног говеђега серума. Свако разблажење
19 рађено је у трипликату. У сваки базенчић са позитивним и негативним серумом додата је иста
20 количина радног разређења изолованог вируса БКК титра 100 TCID₅₀/50 µl. Микротитар плоче
21 су инкубирани на 37°C у трајању од 60 минута. После инкубације у сваки базенчић је додата
22 иста количина суспензије ћелија линије *MDBK* у подлози МЕМ са додатком 10% феталног
23 говеђега серума. Микротитар плоче су затим инкубирани на 37°C у трајању од 7 дана уз
24 свакодневно контролисање на присуство ЦПЕ. При извођењу ВНТ на посебној микротитар
25 плочи вршена је контрола радног разређења вируса, контрола ћелија и повратна “back”
26 титрација вируса.

27 Применом методе директног секвенцирања по Сангер-у (Sanger и сар., 1977) вршено је
28 одређивање редоследа нуклеотида дела *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и *P32* гена изолованог и шест
29 екстрахованих нуклеинских киселина вируса БКК. Анализом резултата електрофорезе у
30 агарозном гелу позитивним налазом сматрано је присуство *PCR* продукта величине 780 бп за
31 *RPO30*, 760 бп за *GPCR*, 664 бп за *EEV* и 681 бп за *P32* ген. У циљу припреме умноженог дела
32 *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и *P32* гена вируса БКК говеда за секвенцирање одговарајући продукти су
33 после електрофорезе исецани из агарозног гела, а ДНК је пречишћен применом комерцијалног
34 кита за пречишћавање (*mi-GEL Extraction Kit*, Метабион, Немачка). Пречишћени *PCR* продукти
35 су затим коришћени за припремање мешавине за извођење реакције секвенцирања (*cycle*
36 *sequencing*) по следећем протоколу: иницијална денатурација на 96°C у трајању од 1 минута,
37 30 циклуса денатурације на температури од 96°C у трајању од 10 секунди, везивање прајмера
38 на 50°C током 5 секунди и елонгација на температури од 60°C у трајању од 4 минута уз
39 примену реагенса комерцијалног кита *BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, САД)*.
40 Мешавина по једном узорку садржала је: 4 µl *Dye Mix*, 2 µl *Dye buffer*, прајмер F (*forward*) 1 µl,
41 воду 7 µl и пречишћеног *PCR* продукта 6 µl. За сваки узорак су припремане две *PCR* мешавине,
42 с тим што је у другој мешавина уместо „*forward*“ прајмера коришћен „*reverse*“ прајмер. Добијени
43 *PCR* продукти су затим третиран са етанолом и ЕДТА (pH 8,0) према упутству произвођача
44 кита, денатурисани применом формамида (*Hi-Di TM Formamide, Applied Biosystems, САД*)
45 према температурном режиму 2 минута на 95°C и 2 минута на 4°C и секвенцирани у секвенцеру
46 *Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, САД)*.

47 Молекуларна и филогенетска анализа добијених нуклеотидних секвенци *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и
48 *P32* гена изолованог и шест екстрахованих нуклеинских киселина вируса БКК говеда извршена
49 је коришћењем програмског пакета *MEGA 6.0* (енг. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) на
50 основу аутоматски формираног стабла помоћу *NJ* (енг. *Neighbor-Joining*) методе. Применом
51 компјутерског софтвера *BLAST* (енг. *Basic Local Alignment Search Tool*), добијене секвенце су
52 поређене са аналогним секвенцама соја *Serbia/Bujanovac/2016* и других *CaPV* доступним у
53 *GenBank* бази података, односно *NCBI (National Center for Biotechnology Information, National*
54 *Institutes of Health)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) у циљу утврђивања сличности и разлика између
55 њих.

56 У циљу филогенетске анализе целог генома вируса БКК сој *Serbia/Bujanovac/2016* коришћено је
57 20 нуклеотидних секвенци изолата *CaPV* који се налазе у међународној банци гена (*GenBank*),
58 и то једанаест нуклеотидних секвенци вируса БКК (*KY702007*, *MH893760*, *KX764645*, *KY829023*,
59 *KX894508*, *KX764643*, *KX764644*, *MH646674*, *AF409137*, *AF325528*, *KX683219*), четири

1 нуклеотидне секвенце вируса богиња коза (*GTPV*) (*KC951854*, *AY077835*, *AY077836*, *KX576657*)
 2 и пет нуклеотидних секвенци вируса богиња оваца (*SPPV*) (*AY077832*, *AY077833*, *AY077834*, *R*
 3 *KT438550*, *R KT438551*).

4 У циљу доказивања присуства генома вируса БКК укупно је испитано 273 клиничких узорка
 5 пореклом од 168 говеда узоркованих током епизоотије БКК. Испитивање је обухватило узорке
 6 крви са ЕДТА (n=77), биоптате коже (n=82) и носне брисеве (n=8) пореклом од 82
 7 невакцинисаних говеда са клиничким симптомима болести, 66 узорака крви невакцинисаних
 8 говеда без клиничких симптома који су били у контакту са оболелим и узорак крви (n=6),
 9 биоптате коже (n=18) и носне брисеве (n=16) 20 вакцинисаних говеда, код којих су се клинички
 10 симптоми испољили после вакцинације атенуираном вакцином (*Neethling live attenuated*
 11 *vaccine*, *Onderstepoort*, Јужна Африка). У циљу валидације нових протокола за извођење *real-*
 12 *time PCR* методе испитани су и узорци крви 35 говеда узорковани током 2014/2015 године на
 13 епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш, као и узорци крви (n=20) и носних брисева (n=20) десет
 14 телади са фарме говеда на територији општина Блаце (Топлички округ) који су вакцинисани
 15 током 2019. године атенуираном вакцином *Neethling live attenuated vaccine* (*Onderstepoort*,
 16 Јужна Африка). Узорци крви и носних брисева вакцинисаних телади узорковани су петог и
 17 десетог дана након вакцинације.

18 Утврђивање присуства генома вируса БКК извршено је применом шест протокола за извођење
 19 *real-time PCR* методе и то: *Bowden* и сар. (2008), *KV-2* (Видановић и сар., 2016), комерцијалним
 20 *real-time PCR* тестом (*LSDV Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease-DIVA*, *Biosellal*, Француска), *KV-vac*
 21 (развијен и стандардизован у Националној референтној лабораторији за каприпоксвирусе
 22 Републике Србије, ВСИ Краљево), новим *real-time PCR* протоколом за детекцију генома
 23 теренског соја вируса - *Теренски Ниш*, и новим *real-time PCR* протоколом за детекцију генома
 24 вакциналног соја вируса - *Вакцинални Ниш*. Поред протокола за извођење *real-time PCR*
 25 испитивање узорака је извршено и применом протокола за извођење *nested PCR* методе
 26 (*Menasherow* и сар., 2014).

27 Екстракција ДНК вируса БКК из узорака крви, носних брисева и биоптата коже говеда извршена
 28 је према упутству произвођача кита за екстракцију нуклеинске киселине *QIAamp[®] cador[®]*
 29 *Pathogen Mini Kit (250)* (*Qiagen*, Немачка). Сви протоколи за извођење *real-time PCR* методе
 30 изведени су употребом комерцијалног мастермикса *Brilliant III Ultra fast qPCR* (*Agilent*, САД) у
 31 укупној запремини реакционе смеше од 25 µl, према температурном режиму за извођење *real-*
 32 *time PCR* реакције који је обухватао: иницијалну денатурацију на температури од 95°C у
 33 трајању од 3 минута, 45 циклуса денатурације на температури од 95°C у трајању 15 секунди и
 34 везивања прајмера на температури од 60°C у трајању од 30 секунди. *Real-time PCR* реакција је
 35 изведена на уређају *Applied biosystems 7500 Fast* (САД).

36 *Real-time PCR* протокол према *Bowden* и сар. (2008) који је специфичан за све каприпоксвирусе
 37 изведен је уз коришћење одговарајућих прајмера и пробе (Табела 1).

38 Табела 1. Редослед нуклеотида за прајмере и пробу за *real-time PCR* - *Bowden* и сар. (2008)

| Протокол за <i>real-time PCR</i> | Прејмер/проба | Секвенце (5' - 3') |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Bowden</i> и сар. (2008) | CaPV-074F1 (50µM) | AAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAA |
| | CaPV-074R1 (50µM) | AAATGAAACCAATGGATGGGATA |
| | CaPV-074P1, MGB TaqMan proba (50µM) | FAM-TGGCTCATAGATTTCT-MGBNFQ |

39 *Real-time PCR* протокол *KV-2* који је специфичан само за теренске сојеве вируса БКК изведен је
 40 према процедури описаној од стране Видановић и сар. (2016). За извођење *KV-2* протокола
 41 коришћени су прајмери и проба приказани у Табели 2.

42 Табела 2. Редослед нуклеотида за прајмере и пробу за *real-time PCR* - *KV-2*

| Протокол за <i>real-time PCR</i> | Прејмер/проба | Секвенце (5' - 3') |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|
| <i>KV-2</i> (Видановић и сар., 2016) | LSD_KV_2_F (50µM) | TGGGATGATAACAACGTTTATG |
| | LSD_KV_2_R (50µM) | ACATTGTCATCCGGTAATGTA |
| | LSD_KV2_Pro_field (50µM) | VIC-TTACCACCTAATGATAGTGTTTATGATTTACC-BHQ1 |

43 Протокол за извођење *nested PCR* методе (*Menasherow* и сар., 2014) је изведен у две реакције
 44 и из наведеног разлога припремане су две реакционе смеше са различитим паровима прајмера
 45 (Табела 3). У првој реакцији су као испитивани узорци коришћени припремљени екстракти ДНК.
 46 Реакција је изведена према температурном режиму: иницијална денатурација на 95°C током 15
 47 минута, 35 циклуса денатурације на 95°C (30 секунди), везивања прајмера на 60°C током 40
 48 секунди, елонгација на 72°C током 1 минута и финална елонгација у трајању од 5 минута на
 49 72°C. У другој реакцији узорке су представљали *PCR* продукти добијени у првој реакцији, а

реакција је изведена према температурном режиму: иницијална денатурација на 95°C током 15 минута, 40 циклуса денатурације на 95°C (30 секунди), везивања прајмера на 57°C током 40 секунди, елонгација на 72°C 1 минут и финална елонгација у трајању од 5 минута на 72°C. Протокол је изведен на *PCR* апарату *PEQ Star (PEQLAB, Немачка)*. Очитавање резултата урађено је на капиларној електрофорези (*MultiNa, Shimadzu, Јапан*), а присуство фрагмента *EEV* гена величине 404 бп, сматрано је позитивним налазом теренског соја вируса БКК, док је присуство два *PCR* продукта величине 184 бп и 229 бп сматрано позитивним налазом на присуство вакциналног соја вируса. Истовремено присуство фрагмената величине 404 бп, 184 бп и 229 бп указивало је на присуство и теренског и вакциналног соја вируса БКК у испитаним узорцима.

Табела 3. Редослед нуклеотида за прајмере за *nested PCR* (*Menasherow и сар., 2014*)

| Протокол за <i>PCR</i> | Прајмер | Секвенце (5' - 3') |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Menasherow и сар., 2014</i> | 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) | CCATTACCCACCTTTTTTTGCC |

Комерцијалним *real-time PCR* тестом (*Bio-T kit® Lumpy Skin Disease - DIVA, Biosellal, Француска*) којим се детектују два таргет региона: таргет *LSDV* који је заједнички за теренске и вакцинални сој (*Neethling soj*) и таргет *LSDV-DIVA* који је специфичан за теренски сој вируса БКК, испитани су узорци говеда код којих су се клинички симптоми болести појавили након вакцинације. Извођење теста и очитавање резултата изведено је према упутству произвођача кита.

Real-time PCR протокол *KV-vac* који је специфичан за вакциналне сојеве вируса БКК изведен је уз коришћење одговарајућих прајмера и пробе за детекцију дела *EEV* гена (Табела 4).

Табела 4. Редослед нуклеотида за прајмере и пробу за *real-time PCR* протокол *KV-vac*

| Протокол за <i>real-time PCR</i> | Прајмер/проба | Секвенце (5' - 3') |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <i>KV-vac</i> , НРП за каприпоксвирусе (подаци нису објављени) | LSDV_vacc_5670f (50µM) | TGCTTGTTCCTTCTCCACT |
| | LSDV_vacc_5829r (50µM) | AAAAATGGGCGCAGTAGTATTT |
| | LSDV_vacc_5726_Pro (50µM) | FAM-CGCTGACATCGTTAGTCCACTCG-BHQ1 |

Дизајнирање прајмера и проба за нове *real-time PCR* протоколе за детекцију теренских и вакциналних сојева вируса БКК извршено је коришћењем софтверских програма *Primer Blast* (Ye и сар., 2012) и *Primer 3* (Untergasser и сар., 2012). Приликом дизајнирања прајмера и пробе за нови *real-time PCR* протокол за детекцију теренских сојева вируса утврђено је да у оквиру *LSDV008* гена теренског соја вируса (*Serbia/Bujanovac/2016*) на позицијама од 5484 до 5508 постоје разлике од 10 нуклеотида (*mismatch*) у односу на вакцинални сој вируса. Утврђена места коришћена су као циљни регион за дизајнирање прајмера и пробе за нови *real-time PCR* протокол - *Теренски Ниш* (Табела 5).

Табела 5. Редослед нуклеотида за прајмере и пробу за *real-time PCR* протокол Теренски Ниш

| Протокол за <i>real-time PCR</i> | Прајмер/проба | Секвенце (5' - 3') | Позиција у геному вируса | Дужина <i>PCR</i> продукта |
|----------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Теренски Ниш | Терен Ниш F (50µM) | CATGCTTGTTCCTTCTCC | 5428-5447 | 150 бп |
| | Терен Ниш R (50µM) | GCTCTTTAAACTATGTTCTTCTTTCC | 5551-5577 | |
| | Терен Ниш P (50µM) | Yakima Yellow - ACTATTGTCATCATTAATCCATCCA -BHQ1 | 5484-5508 | |

Приликом дизајнирања прајмера и пробе за нови *real-time PCR* протокол за детекцију вакциналних сојева вируса утврђено је да у оквиру *LSDV146* гена вакциналног соја вируса (*Neethling soj*) на позицијама од 139842 до 139861 постоји разлика у редоследу од осам нуклеотида (*mismatch*) у односу на теренски сој вируса. Утврђена места коришћена су као циљни регион за дизајнирање прајмера и пробе за нови *real-time PCR* протокол - *Вакцинални Ниш* (Табела 6).

Табела 6. Редослед нуклеотида за прајмере и пробу за протокол Вакцинални Ниш

| Протокол за <i>real-time PCR</i> | Прајмер/проба | Секвенце (5' - 3') | Позиција у геному вируса | Дужина <i>PCR</i> продукта |
|----------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Вакцинални Ниш | Вакц Ниш F (50µM) | CACTAATGTACCTTGTTCCTTGGACA | 139747-139771 | 152 bp |
| | Вакц Ниш R (50µM) | ACGAATATAGATCATCGGTGCCA | 139876-139898 | |
| | Вакц Ниш P (50µM) | FAM-TCGCGTCTCTCCACCTTCA-BHQ1 | 139842-139861 | |

1 Након дизајнирања прајмера и проба испитани су ефикасност, аналитичка специфичност,
2 аналитичка осетљивост, гранична вредност, поновљивост, репродуктивност и робустност нових
3 *real-time PCR* протокола.

4 Ефикасност је израчуната помоћу софтвера *PCR* уређаја на основу стандардне криве
5 формиране на основу C_t вредности добијених испитивањем десетоструких серијских
6 разблажења генома соја *Serbia/Bujanovac/2016* (Теренски Ниш), односно *Neethling* соја вируса
7 (Вакцинални Ниш). Испитивање аналитичке осетљивости (граница осетљивости) извршена је
8 према стандарду (BVL, 2016) испитивањем десетоструких серијских разблажења генома соја
9 *Serbia/Bujanovac/2016* почетне концентрације 2000 TCID₅₀/μl, односно генома *Neethling* соја
10 вируса почетне концентрације 200 TCID₅₀/μl. Свако разблажење рађено је у дупликату, а
11 највеће разблажење са којим је добијена позитивна реакција у 19 понављања сматрало се
12 доњом границом осетљивости на нивоу позданости од 95%. Аналитичка специфичност
13 дизајнираних прајмера и проба нових *real-time PCR* протокола извршена је испитивањем ДНК
14 19 узорка генома *CaPV*, и то: седам узорка теренских сојева вируса богиња оваца
15 (*SPPV_Corum*, *SPPV_Kalmykia_Russia_2016*, *SPPV_Yaroslavl_Russia_2016*, *SPPV_Oman*, три
16 узорка *SPPV Ardel* сој), четири узорка вируса богиња коза (*GTPV Dangarinskyi Russia*,
17 *GTPV_SA*, *GTPV_Oman*, *GTPV_Gorgan, Iraq*), два узорка теренских сојева вируса БКК
18 (*Bulgaria/2016*, *Serbia/Bujanovac/2016*) и шест узорка вакциналних сојева вируса БКК. Као
19 негативна контрола коришћена је култура ћелија (SCIENSANO, CODA CERVA, Белгија, 2017).
20 Гранична вредност (*Cut-off*) одређена је испитивањем генома теренског, односно вакциналног
21 соја вируса БКК разблаженог до границе аналитичке осетљивости које је изведено у двадесет
22 понављања. *Cut-off* вредност израчуната је тако што су добијене средње C_t вредности (*Cycle*
23 *threshold*) (\bar{X}) увећане за две стандардне девијације (SD). Одређивање унакрсне (*exclusivity*)
24 реактивности прајмера и проба извршено је испитивањем узорка изоловане ДНК/РНК
25 референтних сојева 26 различитих микроорганизама.

26 Поновљивост нових *real-time PCR* протокола одређена је испитивањем генома вируса
27 *Serbia/Bujanovac/2016* (концентрације 2 TCID₅₀/μl) односно генома *Neethling* соја вируса
28 (концентрације 0,2 TCID₅₀/μl) које је изведено током пет дана у двадесет понављања (укупно
29 100 понављања). Репродуктивност је утврђена поређењем C_t вредности добијених
30 испитивањем присуства генома соја *Serbia/Bujanovac/2016*, односно *Neethling* соја вируса од
31 стране два аналитичара која су изведена у осам понављања.

32 Робустност нових *real-time PCR* протокола проверена је модификацијама стандардне
33 процедуре које су подразумевале употребу два различита *real-time PCR* уређаја (*Applied*
34 *Biosystems 7500 Fast* и *AriaMx Real-Time PCR*), припрему реакционе смеше користећи три
35 различита мастермикса (*Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix*, *Path ID™ qPCR Master Mix* и
36 *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)*) и употребу различите концентрације прајмера и пробе
37 ($\pm 10\%$ од оптималне). Свака модификација урађена је кроз три понављања, при чему је свако
38 испитивање рађено у дупликату. Након спроведених испитивања одређене су средње C_t
39 вредности (\bar{X}), стандардна девијација (SD) и коефицијент варијације (CV) за сваку
40 модификацију. Испитивања су спроведена од стране два аналитичара и то у Служби за
41 бактеријске зоонозе и молекуларну дијагностику ВСИ Ниш и у НРП за каприпоксвирус
42 Републике Србије (ВСИ Краљево).

43 Након спроведене валидације применом нових *real-time PCR* протокола извршено је
44 испитивање 145 узорка (68 биоптата коже, 22 носних брисева, 55 крви) пореклом од 88 говеда,
45 и то 105 узорка од 68 невакцинисаних говеда и 40 узорка од 20 говеда код којих су се
46 клинички симптоми испољили након вакцинације. Испитивање је обухватило и 35 узорка крви
47 говеда који су узорковани током 2014/2015. године, као и узорке крви и носних брисева 10 десет
48 телади вакцинисаних 2019. године узоркованих петог и десетог дана након вакцинације.

49 Епизоотиолошка анализа епизоотије болести квргаве коже (БКК) обухватала је епизоотиолошко
50 подручје Ветеринарског специјалистичког института Ниш (ВСИ Ниш) које обухвата пет округа:
51 Пчињски, Јабланички, Топлички, Пиротски и Нишавски. У овом делу кандидат је дао кратак
52 опис географских карактеристика испитиваног подручја, са подацима о укупном броју и густини
53 говеда/км², заступљености појединих производних категорија говеда у популационој структури,
54 као и начину држања говеда у време епизоотије БКК 2016. године.

55 У циљу епизоотиолошке анализе, прикупљени су и систематизовани подаци који су се
56 односили на број жарашта, број пријемчивих животиња у жарашту, број оболелих, уинулих и
57 еутаназираних говеда, учесталост појаве клиничких симптома после вакцинације, као и податке
58 о брзини спровођења мера контроле и сузбијања. Као материјал коришћени су епизоотиолошки
59 извештаји, теренски епизоотиолошки записници и други епизоотиолошки подаци Ветеринарског
60 специјалистичког института "Ниш", извештаји Управе за ветерину Министарства пољопривреде

1 и заштите животне средине Републике Србије. У циљу мапирања тј. израде епизоотиолошке
2 карте подаци о географској дужини и ширини за свако жариште преузети су са интернет
3 пларформе *EMPRES Global Animal Disease Information System (EMPRES-i)* ([http://empres-](http://empres-i.fao.org/eipws3g/)
4 [i.fao.org/eipws3g/](http://empres-i.fao.org/eipws3g/)). Мапирање жаришта БКК на епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш урађено је
5 помоћу компјутерског програма *QGIS 3.4 software*. На основу података о географским
6 координатама и тачног датума регистравања жаришта, а на основу претпоставке да је свако
7 ново жариште могло да настане у временском периоду од 1 до 30 дана од просторно најближег
8 жаришта, урађена је анализа просторне и временске дистрибуције епизоотије. Помоћу *on-line*
9 конвертера <https://www.advancedconverter.com/map-tools/find-altitude-by-coordinates>, на основу
10 географске ширине/географске дужине утврђена је надморска висина за свако жариште.
11 Резултати добијени применом молекуларних метода анализирани су дескриптивним
12 статистичким методама (аритметичка средина (\bar{X}), стандардна девијација (SD), коефицијент
13 варијације (CV) и релативни бројеви). Резултати добијени применом различитих протокола
14 поређени су помоћу χ^2 теста, а примењиван је ниво поузданости од 95%. Поређење St
15 вредности добијених различитим *real-time PCR* протоколима извршено је применом t -теста.
16 Одређивање осетљивости и специфичности протокола за извођење методе *real-time PCR* и
17 *nested PCR* урађено је коришћењем *online* статистичког програма *MedCalc statistical software*
18 (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Међусобно слагање резултата добијених
19 применом различитих тестова урађено је *Kappa* статистичком анализом. Статистичка обрада
20 резултата извршена је помоћу статистичког програма *GraphPad Prisma* верзија 6 (*San Diego,*
21 *CA, САД*) и *Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, САД)*.

22 У поглављу **Резултати** испитивања кандидат је прегледно и детаљно представио резултате
23 својих испитивања.

24 Применом методе изолације вируса на култури ткива којим је обухваћено десет узорка
25 биоптата коже у којима је геном вируса БКК детектован применом *real-time PCR* методе, појава
26 цитопатогеног ефекта је утврђена после инокулације само једног узорка и то после друге
27 пасаже. Присуство вируса БКК је потврђено применом ВНТ и молекуларних метода (*real-time*
28 *PCR*). Утврђени титар изолата вируса БКК је износио $6,0 \log_{10}$ TCID₅₀ у 1,0 ml. Применом ВНТ
29 изоловани вирус је неутрализован специфичним позитивним серумом против вируса БКК у титру
30 1:16 односно $4 \log_2$. Изоловани сој добио је назив *Пчињ 1* је други изолат вируса БКК са
31 подручја Републике Србије.

32 Методом директног секвенцирања по Сангер-у добијене су секвенце делова *RPO30*, *GPCR*,
33 *EEV* и *P32* гена вируса *Пчињ 1* и шест екстрахованих нуклеинских киселина вируса БКК из
34 узорка биоптата коже говеда. Филогенетском анализом утврђено је да је редослед секвенци
35 нуклеотида делова *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и *P32* гена соја *Serbia/Bujanovac/2016* и *Пчињ 1*, као и
36 шест екстрахованих нуклеинских киселина вируса био идентичан (100% сличности између
37 делова аналогних нуклеотидних секвенци). Такође је утврђено је да нуклеотидне секвенце оба
38 соја вируса изолована на подручју Републике Србије (*Serbia/Bujanovac/2016* и *Пчињ 1*), као и
39 шест екстрахованих нуклеинских киселина вируса имају 100% сличности са аналогним
40 секвенцама теренских сојева вируса БКК изолованих на подручју Грчке (*Evros/GR/15*), Руске
41 Федерације (*Dagestan/2015*), Израела (155920/2012) и Јужне Африке (*Neethling Warmbaths LW*),
42 док је нижи степен сличности (99,98-99,99%) утврђен са вакциналним сојевима вируса БКК
43 (*Neethling-LSD vaccine-OBP*, *SIS-Lumpyvax vaccine* и *Neethling-Herbivac vaccine*). Извршеном
44 филогенетском анализом утврђено је да се на основу секвенци делова *RPO30*, *GPCR* и *P32*
45 гена у посебан подкластер који се налази између подкластера теренских и вакциналних сојева
46 издваја сој изолован у Руској Федерацији (*LSDV/Russia/Saratov/2017*), док се на основу
47 секвенци *EEV* гена овај сој групише у подкластер са вакциналним сојевима вируса БКК.

48 Анализом филогенетског стабла формираног на основу поређења целих генома двадесет
49 каприпиксовируса (*CaPV*) који се налазе у међународној банци гена (*GenBank*) утврђено је да се
50 сој *Serbia/Bujanovac/2016* налази у подкластеру са осталим теренским сојевима вируса БКК
51 изолованих у различитим деловима света. Највећа подударност у редоследу нуклеотида целог
52 генома соја *Serbia/Bujanovac/2016* утврђена је са сојевима изолованим у Грчкој (*Evros/GR/15*)
53 (99,99%), Израелу (155920/2012) (99,98%), Руској Федерацији (*Dagestan/2015*) (99,96%) и Јужној
54 Африци (*Neethling Warmbaths LW*) (99,95%). Нижи степен подударности утврђен је са
55 вакциналним сојевима вируса *Neethling - LSD vaccine - OBP* (98,88%) и *SIS - Lumpyvax vaccine* и
56 *Neethling - Herbivac vaccine* (98,87%). Најнижи степен подударности (99,07%), утврђен је са
57 сојем *LSDV/Russia/Saratov/2017* који се на основу анализе целог генома издваја у посебан
58 подкластер вируса БКК, који се налази између теренских и вакциналних сојева вируса.

59 Од укупно 167 узорка пореклом од говеда са клиничким симптомима болести применом *real-*
60 *time PCR* протокола према *Bowden* и *cap.* (2008) геном вируса БКК је детектован у 79,6%

1 (133/167) узорака, и то 87,8% (72/82) биоптата коже, 62,5% (5/8) носних брисева и 72,7% (56/77)
2 крви. Од 66 узорака крви говеда без испољених клиничких симптома геном вируса БКК је
3 детектован у једном узорку. Од 40 узорака пореклом од 20 говеда са клиничким симптомима
4 испољених након вакцинације геном вируса БКК је детектован у 39 (97,5%) узорака. Применом
5 протокола према *Bowden и сар.* (2008) свих 20 вакцинисаних говеда је било позитивно на
6 присуство вируса БКК. Испитивањем истих узорака протоколом *KV-2* геном вируса БКК
7 детектован је у 78,4% (131/167) узорака и то 87,8% (72/82) биоптата коже, 62,5% (5/8) носних
8 брисева и 70,1% (54/77) узорака крви. Од 66 узорака крви говеда без испољених клиничких
9 симптома геном вируса БКК је детектован у једном узорку. Као и применом протокола *Bowden и*
10 *сар.* (2008) геном вируса БКК детектован је у узорцима свих 20 вакцинисаних говеда. Применом
11 χ^2 теста није установљена статистички значајна разлика у резултатима добијеним применом
12 ова два *real-time PCR* протокола. На основу добијених *Ct* вредности које су се кретале од 19,86
13 (*Bowden и сар.*, 2008) и 20,15 (*KV-2*) за биоптате коже, 27,51 (*Bowden и сар.*, 2008) и 27,96 (*KV-*
14 *2*) за носне брисеве и 28,52 (*Bowden и сар.*, 2008) и 30,18 (*KV-2*) за узорке крви највећа
15 концентрација вируса утврђена је у узорцима биоптата коже.

16 Од укупно 105 узорака пореклом од 68 невакцинисаних говеда са клиничким симптомима
17 болести применом *nested PCR* протокола геном теренског соја вируса БКК детектован је у 91
18 (86,7%) узоруку пореклом од 60 говеда, са највећим процентом позитивних биоптата коже
19 (96,0%), затим узорака крви (81%), и узорака носних брисева (50,0%). Испитивањем узорака
20 пореклом од вакцинисаних говеда са симптомима болести испољених након вакцинације геном
21 вируса БКК је утврђен у 37 (92,5%) узорака, и то 18 (100%) узорака биоптата коже, 14 (87,5%)
22 узорака носних брисева и 5 (83,3%) узорака крви. Након примене рестрикционог ензима у 33
23 узорака (89,19%) пореклом од 17 говеда утврђен је само теренски сој вируса БКК, у три узорка
24 (8,11%) (два узорка крви и једном узорку носног бриса) пореклом од три животиње утврђен је
25 теренски и вакцинални сој вируса, док је у једном узорку (2,70%) носног бриса утврђен само
26 вакцинални сој вируса БКК. У узорцима пореклом од вакцинисаних телади *nested PCR*
27 протоколом вакцинални сој је детектован у три узорка, два узорка крви узоркованих петог и
28 десетог дана и једном узорку носног бриса узоркованог десетог дана после вакцинације.

29 Испитивањем 40 узорака вакцинисаних говеда са испољеним симптомима болести
30 комерцијалним *real-time PCR* тестом (*Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease-DIVA, wild strains*) утврђено
31 је да су све животиње биле позитивне на теренски сој вируса. Геном теренског соја вируса БКК
32 је утврђен у 39 узорака, при чему су у 4 узорака (10,0%) доказани и теренски и вакцинални сој
33 вируса БКК.

34 Испитивањем узорака пореклом од говеда код којих су се симптоми испољили након
35 вакцинације *real-time PCR* протоколом *KV-vac* вакцинални сој вируса је, као и применом
36 комерцијалног *real-time PCR* теста утврђен у 4 узорка (10,0%), и то у 2 узорка носног бриса и 2
37 узорка крви. Испитивањем узорака пореклом од вакцинисаних телади вакцинални сој вируса
38 БКК је као и *nested PCR* протоколом такође утврђен у три узорка (7,50%), два узорка крви
39 узоркованих петог и десетог дана и једном узорку носног бриса узоркованог десетог дана после
40 вакцинације.

41 На основу спроведених испитивања и резултата валидације утврђено је да нови *real-time PCR*
42 протоколи за детекцију теренских и вакциналних сојева вируса имају задовољавајуће
43 перформансе. Испитивањем аналитичке специфичности утврђено је да *real-time PCR* протокол
44 *Теренски Ниш* није специфичан само за теренске сојеве вируса БКК, с обзиром да се овим
45 протоколом детектују и вирус богиња оваца и богиња коза. Имајући у виду да се овим
46 протоколом не детектују вакцинални сојеви вируса нови протокол се може користити у
47 дијагностици БКК у земљама слободним од богиња оваца и коза.

48 Утврђена ефикасност протокола *Теренски Ниш* износила је 99,66%, док је просечна вредност
49 нагиба криве износила -3,33. Граница осетљивости износила је 0,4 TCID₅₀/ml, а гранична
50 вредност (*Cut-off*) износила је *Ct* =40, што значи да се узорак са добијеном вредности *Ct* ≤ 40
51 сматра позитивним. Спроведеним испитивањем искључена је унакрсна реактивност (*cross*
52 *reactivity-exclusivity*) прајмера и пробе дизајнираних за овај протокол. Утврђена је добра
53 поновљивост и репродуктивност новог протокола. Испитивањем робустности утврђено је да је
54 нови *real-time PCR* протокол успешно примењен приликом испитивања узорка у три
55 понављања за сваку модификацију.

56 На основу добијених резултата утврђено је да је да *real-time PCR* протокол *Вакцинални Ниш*
57 специфичан само за вакцинални сој вируса БКК. Ефикасност је износила је 98,84%, а просечна
58 вредност нагиба криве -3,35. Граница осетљивости износила је 0,2 TCID₅₀/ml, а гранична
59 вредност (*Cut-off*) *Ct*=40. Утврђена је добра поновљивост и репродуктивност. Испитивањем

1 робустности утврђено је да је нови *real-time PCR* протокол успешно примењен приликом
2 испитивања узорка у три понављања за сваку модификацију.

3 *Real-time PCR* протоколом *Теренски Ниш* генома вируса БКК утврђен је у 95,2% (138/145)
4 узорака, и то 100% (68/68) узорака биоптата коже, 92,7% (51/55) узорака крви и 72,7% (16/22)
5 узорака носних брисева. Од 105 узорака који потичу од невакцинисаних говеда генома вируса
6 БКК утврђен је у 94,3% (99/105) узорака, и то 100% (50/50) узорака биоптата коже, 66,7% (4/6)
7 узорака носних брисева и 91,8% (45/49) узорака крви. Испитивањем узорака вакцинисаних
8 говеда геном вируса БКК је детектован у 39 (97,5%). Сви узорци пореклом од вакцинисане
9 телади и узорци крви говеда узорковани 2014/2015. године су били негативни.

10 Применом *real-time PCR* протокола *Вакцинални Ниш* геном вируса БКК је детектован у укупно
11 2,76% (4/145) испитаних узорака. Позитивни узорци, и то два узорка крви и два узорка носних
12 брисева су потицали од вакцинисаних говеда са симптомима испољеним после вакцинације.
13 Испитивањем узорака крви и носних брисева вакцинисаних телади вакцинални сој вируса
14 детектован је у три узорка, два узорка крви и једном узорку носног бриса.

15 У циљу одређивања специфичности и осетљивости протокола за детекцију теренских сојева
16 вируса као референтни тест коришћен је протокол за извођење *real-time PCR* методе *Bowden* и
17 *сар.* (2008). Израчуната дијагностичка осетљивост протокола *Теренски Ниш* износила је
18 99,28%, а специфичност 100%. У односу на алтернативни тест - *KV-2* протокол осетљивост
19 протокола *Теренски Ниш* износила је 100%, а специфичност 87,50%. Добијене вредности *Карпа*
20 сагласност протокола *Bowden* и *сар.* (2008) и *KV-2* ($\kappa=0,850$), *Bowden* и *сар.* (2008) и *Теренски*
21 *Ниш* ($\kappa=0,919$) и *KV-2* и *Теренски Ниш* ($\kappa=0,930$) указују на идеалну усаглашеност ова три
22 протокола, као и потпуну усаглашеност наведених протокола са комерцијалним *real-time PCR*
23 тестом ($\kappa=1$). Применом четири *real-time PCR* протокола није установљена статистички значајна
24 разлика у добијеним резултатима (χ^2 тест 0,07; $p>0,05$, χ^2 тест 0,08; $p>0,05$ и χ^2 тест 0,07;
25 $p>0,05$).

26 У односу на протокол према *Bowden* и *сар.* (2008) утврђена дијагностичка осетљивост *nested*
27 *PCR* протокола износила је 91,37%, а дијагностичка специфичност 100%, док је у односу на *KV-*
28 *2* протокол дијагностичка осетљивост износила 92,70%, а дијагностичка специфичност 100%.
29 Поређењем *nested PCR* за теренски сој вируса (*Menasherow* и *сар.*, 2014) са протоколима за
30 извођење *real-time PCR* методе *Карпа* статистичком анализом и добијених вредности у односу
31 на протоколом *Bowden* и *сар.* (2008) ($\kappa=0,467$), протокол *KV-2* ($\kappa=0,584$), протокол *Теренски Ниш*
32 ($\kappa=0,527$) и комерцијални *real-time PCR* тест ($\kappa=0,375$) утврђено је да између *real-time PCR* и
33 *nested PCR* методе постоји прилична подударност. Поређењем резултат добијених применом
34 протокола за извођење методе *real-time PCR Bowden* и *сар.* (2008), *KV-2* и *Теренски Ниш* у
35 односу на резултате добијене применом *nested PCR* методе установљена је статистички
36 значајна разлика у добијеним резултатима (χ^2 test 6,54; $p<0,05$, χ^2 test 4,22 $p<0,05$ и χ^2 test 5,30;
37 $p<0,05$).

38 *Карпа* статистичком анализом утврђена је потпуна сагласност ($\kappa=1$) сва три *real-time PCR*
39 протокола за детекцију вакциналног соја вируса (*KV-vac*, *Вакцинални Ниш* и комерцијалног *real-*
40 *time PCR* теста), као и потпуна сагласност у односу на *nested PCR* за вакцинални сој вируса
41 ($\kappa=1$).

42 На подручју Републике Србије први случај БКК регистрован је 6. јуна 2016. године у Пчињском
43 округу, на територији општине Бујановац, село Љиљанце (42°25'57.4" Н; 21°48'54.0" Е).
44 Жариште се налазило на удаљености од 25 км од најближих жаришта БКК у Северној
45 Македонији (*Луке* и *Крива Паланка*), док су се два нова жаришта регистрована 8. јуна на
46 територији општине Босилеград (Горња Лисина и Извор) налазила на удаљености од 30 км од
47 најближих жаришта у Бугарској (*Скринуано* и *Ћустендил*). Погранично подручје према
48 Северној Македонији и Бугарској карактеришу предели са надморском висином од 662 м до
49 1922 м. Анализом просторне и временске дистрибуције епизоотије прва жаришта у Републици
50 Србији се могу довести у везу са наведеним жариштима у Северној Македонији и Бугарској. У
51 оквиру докторске дисертације приказана је мапа могућег пута уласка вируса БКК на територију
52 Републике Србије. Након мапирања жаришта процењен је степен ширења епизоотије БКК
53 изражен у км/недељно. Анализом просторне и временске дистрибуције епизоотије БКК
54 утврђено је да се 50% жаришта налазило на удаљености од 1,89 до 8,88 км, док се временски
55 период појаве нових жаришта кретао у опсегу од 1 до 29 дана. Утврђено просечно време
56 кретања епизоотије износило је 4,32 км/ 9 дана.

57 На основу обрађених епизоотиолошких података утврђено је да је током трајања епизоотије на
58 епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш регистровано 189 жаришта (90 жаришта пре вакцинације
59 и 99 жаришта након вакцинације) што је 84% од укупног броја регистрованих жаришта у

1 Републици Србији (n=225). Највећи број жаришта БКК регистрован је на подручју Пчињског
2 округа (n=169), затим у Пиротском округу 11 жаришта, Јабланичком 7 и Топличком 2, док на
3 подручју Нишавског округа није било регистрованих случајева БКК.
4 На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш епизоотија БКК је трајала до 10 августа 2016. године
5 са највећим бројем жаришта регистрованих у јулу месецу (n=101) и јуну месецу (n=85) ($p > 0,05$).
6 Применом мера контроле и сузбијања као и спровођењем вакцинације број жаришта је значајно
7 смањен у августу (n=3) (χ^2 тест 63,96; $p < 0,05$; χ^2 тест 75,54; $p < 0,05$). Током септембра у
8 испитиваном подручју није пријављен ниједан случај болести. Епизоотија је најдуже трајала на
9 подручју Пчињског, а најкраће на подручју Топличког округа.
10 На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш жаришта БКК су регистрована на надморској висини
11 од 260 до 1495 м, при чему је 50% жаришта регистровано на надморској висини од 782 м до
12 1234 м, а више од 90% жаришта на надморској висини већој од 500 м. Просечна надморска
13 висина регистрованих жаришта износила је 992 м.
14 Утврђена просечна стопа морбидитета стада износила је 13,6%, са највећом стопом
15 морбидитета у Пчињском округу (16,9%), затим Јабланичком (13,1%) Топличком (11,8%) и
16 најнижом у Пиротском округу (4,1%) (χ^2 тест 35,18; $p \leq 0,001$). БКК није регистрована једино у
17 Нишавском округу. Утврђене су разлике у стопи морбидитета у односу на производне
18 категорије говеда, са највећим бројем оболелих млечних крава (208; 94,55%), у односу на
19 телад (6; 2,73%), јунице (4; 1,82%) приплодне и товне бикове (2; 0,90%) (χ^2 тест 39,88; $p \leq 0,01$).
20 Просечна стопа mortalитета и леталитета износила је 0,4% односно 3,25%. Mortалитет је
21 регистрован у два округа, Пчињском (0,5%) и Јабланичком округу (1,6%), док је леталитет
22 износио 12,5% у Јабланичком и 3,1% у Пчињском округу. Mortалитет је забележен само код
23 млечних крава (5; 0,48%) и телади (2; 0,51). Стопа леталитета била је значајно већа код телади
24 (33,3%) у односу на млечне краве (2,4%) (χ^2 тест 15,85; $p < 0,001$). У односу на старосне
25 категорије највише је оболелих говеда старијих од 5 година (126; 57,3%), у односу на говеда
26 старости између 2 и 5 година (45; 20,5%) и животиња млађих од 2 године (49; 22,3%) (χ^2 тест
27 56,85; $p \leq 0,01$). У односу на број животиња у стаду/жаришту утврђено је да је БКК у највећем
28 проценту (50%) регистрована у жариштима са просечним бројем говеда од 3 до 10 (6
29 животиња) у 28,6% случајева у жариштима са мање од 3, и у 21,4% случајева у жариштима са
30 више од 10 животиња (χ^2 тест 19,18; $p \leq 0,01$).
31 У оквиру докторске дисертације описане су и анализирани мере контроле и сузбијања БКК које
32 су спровођене на основу одлуке Министарства и Националног кризног центра за контролу
33 посебно опасних заразних болести Републике Србије. Током сузбијања БКК у Републици
34 Србији укупно је еутаназирано 709 говеда, пре почетка вакцинације 567 (80,0%) и током
35 вакцинације 142 (20,0%). На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш укупно је еутаназирано 603
36 грла говеда (84,5% од укупног броја еутаназираних говеда на територији Р. Србије), при чему је
37 пре кампање вакцинације еутаназиран значајно већи број говеда (479; 79,44%), у односу на
38 период после вакцинације (124; 20,56%), (χ^2 тест 244,71, $p \leq 0,001$). Утврђене разлике у броју
39 еутаназираних животиња доводе се у везу са чињеницом да су пре спровођења вакцинације
40 еутаназирана сва говеда у жаришту, док је након вакцинације спровођена еутаназија само
41 говеда са испољеним клиничким симптомима болести. Ово се показало као добар метод, како у
42 сузбијању болести, тако и у смањењу економских штета.
43 На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш укупно је вакцинисано 92760 (100% у односу на број
44 говеда на испитиваном подручју, односно 10,6% у односу на број вакцинисаних говеда у Р.
45 Србији). Вакцинације свих говеда (100%) завршена је на подручју Пчињског и Јабланичког
46 округа у периоду од 24.06.2016. до 11.07.2016. године, а на подручју Пиротског, Топличког и
47 Нишавског округа од 27.06.2016. до 25.07.2016. године.
48 Клинички симптоми након вакцинације пријављени су код 124 животиње (0,13% од укупног
49 броја вакцинисаних на испитиваном подручју). Клинички симптоми регистровани су у периоду
50 од 1 до 30 дана (просечно 8,77 дана) после вакцинације, при чему је у 95,2% случајева
51 регистрована повишена телесна температура са дифузно распоређеним чворовима по кожи,
52 код 46,8% чворови су регистровани на вимену, а код 43,5% случајева на вулви. Пад млечности
53 је регистрован у 28,2%, а исцедак из носа у 20,0% случајева. Оток екстремитета регистрован је
54 у 15,3% случајева, а улцерозне промене и красте као и појава дијареје у 1,6% случајева.
55 Испитивањем узорака (крви, носних брисева и биоптата коже) 20 вакцинисаних говеда са
56 испољеним симптомима код свих испитаних говеда доказано је присуство теренског соја, док је
57 код четири животиње истовремено детектован и теренски и вакцинални сој вируса БКК.
58 Анализом података о временском периоду од постављања сумње на БКК до завршетка мера
59 сузбијања (еутаназија, закопавање лешева, дезинфекција и дезинсекција) за свих 189 жаришта
60 утврђено је да је тај период износио просечно 2,2 дана, при чему су у 81,0% (153/189) жаришта

1 мере сузбијање спроведене у периоду до 72 сати, од тога у 46,6% (88/189) жаришта у периоду
2 до 24 сати. У само 19,0% (36/189) жаришта мере сузбијања су спроведене после 72 сата, а
3 најдужи период (15 дана) регистрован је у једном жаришту. Добијени резултати показали су да
4 је ветеринарска служба показала изузетну спремност и ефикасност у сузбијању БКК, што је
5 допринело спречавању даљег ширења болести и додатних економских губитака, како на
6 подручју Републике Србије, тако и у земљама у окружењу.

7 У поглављу **Дискусија** кандидат је свеобухватно анализирао добијене резултате, критички их
8 упоређујући са резултатима студија спроведених од стране других истраживача приказаним у
9 наведеној литератури.

10 У **списку литературе**, кандидат наводи 156 релевантних библиографских јединица од којих је
11 74 (47,4%) објављено у последњих пет година, односно 37 (23,7%) у последње три године.

12 VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској 13 дисертацији):

14 На основу добијених резултата истраживања изведени су следећи закључци:

- 15 1. Методом изолације вируса на култури ћелија вирус болести квргаве коже говеда је
16 изолован после друге пасаже из узорка биоптата коже, а присуство вируса је потврђено
17 применом класичних (ВНТ) и молекуларних метода лабораторијске дијагностике (*real-time*
18 *PCR*). Изоловани сој - *Пчињ 1* је други изолат вируса болести квргаве коже говеда са
19 подручја Републике Србије.
- 20 2. Филогенетском анализом уз примену *Neighbor-Joining* методе установљено је да су
21 нуклеотидне секвенце дела *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и *P32* гена вируса *Пчињ 1* и шест
22 екстрахованих нуклеинских киселина вируса из биопта коже говеда биле 100% идентичне
23 са аналогним секвенцама соја вируса *Serbia/Bujanovac/2016* и аналогним секвенцама
24 теренских сојева вируса болести квргаве коже говеда пореклом из Грчке, Израела, Руске
25 Федерације и Јужне Африке.
- 26 3. Анализом филогенетског стабла формираног на основу поређења целих генома
27 каприпоксвируса (*CaPV*) који се налазе у међународној банци гена (*GeneBank*) утврђено је
28 да се вирус изолован у Републици Србији (*Serbia/Bujanovac/2016*) налази у подкластеру са
29 теренским сојевима вируса болести квргаве коже говеда изолованих из различитих делова
30 света. Највећа подударност у редоследу нуклеотида утврђена је са сојевима вируса
31 пореклом из Грчке (*Evros/GR/15*) (99,99%), Израела (*155920/2012*) (99,98%), Руске
32 Федерације (*Dagestan/2015*) (99,96%) и Јужне Африке (*Neethling Warmbaths LW*) (99,95%).
33 Мањи степен подударности утврђен је са вакциналним сојевима вируса болести квргаве
34 коже *Neethling-LSD vaccine-OBP* (98,88%), *SIS-Lumpyvax vaccine* и *Neethling-Herbivax*
35 *vaccine* (98,87%) и сојем изолованим у Руској Федерацији (*LSDV/Russia/Saratov/2017*)
36 (99,07%).
- 37 4. Присуство вируса болести квргаве коже утврђено је у 87,8% узорака биоптата коже, 72,7%
38 узорака крви и 62,5% узорака носних брисева говеда са испољеним клиничким
39 симптомима болести. Налаз високог процента позитивних узорака крви и носних брисева
40 показали су да су узорци узимани у раној фази инфекције. На основу добијених резултата
41 препоручује се да се у циљу сигурне дијагнозе болести квргаве коже говеда од исте
42 животиње испитају различите врсте узорака.
- 43 5. Поређењем резултата испитивања добијених применом протокола за извођење методе
44 *real-time PCR*, *Bowden* и сар. (2008) и *KV-2* на основу добијене вредности $k=0,850$ утврђен
45 је идеални ниво сагласности између ова два протокола која су се користила у дијагностици
46 болести квргаве коже говеда на територији Републике Србије.
- 47 6. Поређењем са *real-time PCR* протоколом *Bowden* и сар. (2008) специфичност *nested PCR*
48 протокола износила је 100%, а осетљивост 91,37%. Сагласност између ова два протокола
49 износила је 0,467 што је у рангу приличне подударности. У односу на *real-time PCR*
50 протокол *KV-2* специфичност *nested PCR* протокола износила је 100%, а осетљивост
51 92,70%, док је утврђена сагласност између ова два протокола износила 0,584 што је у
52 рангу приличне подударности. На основу спроведених испитивања и добијених резултата
53 утврђено је да предност у дијагностици имају протоколи за извођење *real-time PCR* методе
54 у односу на *nested PCR* због веће осетљивости, али и бржег и једноставнијег извођења.
- 55 7. Добијени резултати испитивања су потврдили да је нови протокол за извођење *real-time*
56 *PCR* методе под називом *Теренски Ншш* специфичан у идентификацији свих
57 каприпоксвируса. У односу на *real-time PCR* протокол *Bowden* и сар. (2008), новим
58 протоколом могу се разликовати теренски од вакциналних сојева вируса болести квргаве
59 коже. Поређењем са протоколом *Bowden* и сар. (2008) специфичност протокола *Теренски*

1 Ниш износила је 100%, а осетљивост 99,28%, док је у односу на протокол KV-2 утврђена
2 специфичност 87,50% и осетљивост 100%. Утврђена је потпуна сагласност протокола
3 Теренски Ниш са комерцијалним *real-time PCR* тестом ($\kappa=1$), идеална сагласност са
4 протоколом KV-2 ($\kappa=0,930$) и протоколом Bowden и сар. (2008) ($\kappa=0,919$) и прилична
5 сагласност са *nested PCR* протоколом ($\kappa=0,527$). Добијени резултати показали су да је
6 протокол Теренски Ниш поуздан тест који се може користити у дијагностици болести
7 кржаве коже говеда у ензоотским подручјима где нису присутне богиње оваца и коза.

8. Добијени резултати испитивања су потврдили да је нови протокол за извођење *real-time PCR* методе под називом *Вакцинални Ниш* специфичан у идентификацији вакциналних сојева вируса болести кржаве коже говеда. *Карра* статистичком анализом утврђена је потпуна сагласност ($\kappa=1$) између *real-time PCR* протокола *Вакцинални Ниш*, *KV-vac*, комерцијалног *real-time PCR* теста и *nested PCR*.
9. На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш током трајања епизоотије укупно је регистровано 189 жаришта болести кржаве коже говеда од којих 90 пре и 99 жаришта током кампање вакцинације. Највећи број жаришта регистрован је у Пчињском округу (169), у односу на Пиротски (11), Јабланички (7) и Топлички округ (2). Није утврђен утицај надморске висине на ширење епизоотије имајућу у виду да су жаришта регистрована на подручјима са надморском висином од 260 до 1495 м, при чему је више од 50% жаришта регистровано на надморској висини од 782 до 1234 м, просечно 992 м. Болест кржаве коже чешће је регистрована у жариштима са просечним бројем говеда од 3 до 10 (50%) у односу на жаришта са мање од 3 (28,6%) и више од 10 животиња (21,4%).
10. Мапирањем свих жаришта и применом просторно временске анализе утврђено је да се епизоотија болести кржаве коже говеда на епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш ширила просечном брзином од 4,3км/9 дана. Узимајући у обзир просторну и временску удаљеност најближих жаришта у суседним земљама, надморску висину у пограничном подручју, као и брзину ширења епизоотије може се претпоставити да су хематофагни инсекти имали кључну улогу у преношењу вируса болести кржаве коже говеда на територију Републике Србије, као и у локалном ширењу вируса на испитиваном подручју.
11. Утврђена просечна стопа морбидитета на нивоу стада износила је 13,6%, морталитета 0,4% и леталитета 3,25%. Стопа морбидитета је била значајно већа у категорији млечних крава (94,55%), у односу на телад (2,73%), јунице (1,82%) и приплодне и товне бикове (0,90%). Леталитет је утврђен само код телади (33,3%) и млечних крава (2,4%). Највећа преваленција је утврђена код говеда старијих од 5 година (57,3%), у односу на говеда старости од 2 до 5 година (20,5%) и млађих од 2 године (22,3%).
12. На епизоотиолошком подручју ВСИ Ниш клинички симптоми регистровани су, у периоду од 1 до 30 (просечно 8,7) дана након вакцинације, код 0,13% од укупног броја вакцинисаних говеда. Испитивањем узорака вакцинисаних говеда у 97,5% узорака утврђен је само теренски, а у 10% узорака и теренски и вакцинални сој вируса. На основу чињенице да је теренски сој вируса детектован код свих вакцинисаних говеда потврђено је да су клиничке промене последица инфекције вирусом болести кржаве коже.
13. Добијени резултати указују да је у подручјима у којима се спроводи вакцинација говеда против болести кржаве коже неопходна примена поузданих тестова којима је могуће разликовати теренске и вакциналне сојеве вируса у испитујућим узорцима. На овај начин се једино сигурно може утврдити присуство инфицираних животиња и искључити могуће поствакциналне компликације.
14. Спроведена испитивања и добијени резултати потврдили су оправданост примене молекуларних метода, како у брзој и поузданој дијагностици болести кржаве коже говеда, тако и у процени епизоотиолошке ситуације.

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

52 Приказ и тумачење резултата истраживања су у складу са постављеним циљевима докторске
53 дисертације. Добијене резултате кандидат је приказао табеларно, сликама и графиконима.
54 Описи и тумачења резултата су јасни, детаљни и свеобухватни, у складу са најновијим научним
55 сазнањима. Изведени закључци произилазе из добијених резултата, логични су и јасно
56 формулисани.

57 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

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

1 Докторска дисертација кандидата Марије Манић под насловом „Примена молекуларних метода
2 у дијагностици болести квргаве коже говеда на територији Републике Србије и њихов значај у
3 процени епизоотиолошке ситуације“ је написана у складу са образложењем наведеним у
4 пријави теме.

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

7 Докторска дисертација кандидата Марије Манић садржи све елементе и у складу је са
8 захтевима који су прописани за завршену докторску дисертацију.

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

10 Оригинални допринос науци докторске дисертације кандидата Марије Манић под насловом
11 „Примена молекуларних метода у дијагностици болести квргаве коже говеда на територији
12 Републике Србије и њихов значај у процени епизоотиолошке ситуације“ заснива се на
13 следећем:

14 1. Молекуларном и филогенетском анализом изолованог и шест екстрахованих нуклеинских
15 киселина вируса болести квргаве коже говеда на основу секвенци *RPO30*, *GPCR*, *EEV* и *P32*
16 гена и њиховог упоређивање са аналогним нуклеотидним секвенцама првог изолата вируса
17 *Serbia/Bujanovac/2016* утврђено је да је на подручју Р. Србије циркулисао један сој вируса.
18 Филогенетском анализом целог генома соја *Serbia/Bujanovac/2016* утврђено је да је сој вируса
19 из Републике Србије сличан са другим теренским сојевима вируса који циркулишу широм света,
20 2. Поређењем шест протокола за извођење *real-time PCR* методе, као и њиховим поређењем са
21 протоколом за извођење *nested PCR* указано је на већу поузданост *real-time PCR* у
22 дијагностици БКК.

23 3. Припремом и стандардизацијом два протокола за извођење *real-time PCR* методе дат је
24 велики допринос дијагностици болести квргаве коже говеда. Имајући у виду да је *real-time PCR*
25 протокола за детекцију вакциналних сојева вируса БКК један од првих *real-time PCR* протокола
26 у свету којим се са великом сигурношћу детектују само вакцинални сојеви вируса, указује на
27 изузетан научни допринос спроведених истраживања.

28 5. Први пут је у Републици Србији урађена свеобухватна епизоотиолошка анализа епизоотије
29 БКК чиме је дат значајан допринос у разумевању епизоотиолошких карактеристика ове
30 егзотичне болести говеда. Значај и оригиналност епизоотиолошких истраживања, као
31 истраживања из молекуларне епизоотиологије, потврђени су објављивањем резултата у
32 научном раду који је публикован у међународном часопису изузетних вредности (категорије
33 M21a).

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

36 Не

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

44 **Marija Manić**, Marko Stojiljković, Miloš Petrović, Jakov Nišavić, Dragan Bacić, Tamaš Petrović, Dejan
45 Vidanović, Sonja Obrenović, 2019. Epizootic features and control measures for lumpy skin disease in
46 south - east Serbia in 2016, *Transboundary and Emerging Diseases*; 66:2087–2099;

47 Међународни часопис изузетних вредности - **M21a** ИФ₂₀₁₉ - **4,188**; петогодишњи ИФ₂₀₁₉ - **3,669**.

49 **X ПРЕДЛОГ:**

50 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три**
51 **понуђених могућности):**

- 52 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

1 ДАТУМ
2 7.07. 2020. године
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1. Др Соња Обреновић, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

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

3. Др Драган Баџић, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

4. Др Јаков Нишавић, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

5. Др Тамаш Петровић, научни саветник,
Научни институт за ветеринарство
„Нови Сад“
