

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

DIMITRIJE J. GLIŠIĆ

IZOLACIJA I GENSKA KARAKTERIZACIJA VIRUSA
AFRIČKE KUGE SVINJA U SRBIJI U PERIODU 2019-
2023. GODINE

DOKTORSKA DISERTACIJA
U BEOGRADU, 2025. GODINE

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

DIMITRIJE J. GLIŠIĆ

ISOLATION AND GENETIC CHARACTERISATION OF
AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN SERBIA IN THE
PERIOD 2019 - 2023

PHD thesis
BELGRADE, 2025

Mentori:

Mentor 1: Prof. dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu

Mentor 2: Dr sci. vet. med. Vesna Milićević, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Članovi komisije:

1. Prof. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Radiša Prodanović, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ivan Toplak, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Ljubljani

Datum odbrane:

SADRŽAJ

UVOD.....	1
PREGLED LITERATURE.....	3
ETIOLOGIJA.....	3
O virusu	3
EPIZOOTIOLOGIJA	8
Geografska rasprostranjenost	8
Prenošenje virusa.....	10
PATOGENEZA.....	12
KLINIČKI SIMPTOMI	13
Klinički znaci i patomorfološke promene	13
DIJAGNOSTIKA.....	13
Dijagnostika	13
Izolacija virusa.....	14
Detekcija virusnih antigena.....	16
Detekcija antitela	17
Diferencijalna dijagnostika	18
PREVENCIJA I KONTROLA.....	19
CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	20
MATERIJAL I METODE.....	21
MATERIJAL	21
EKSTRAKCIJA DNK:	24
REAL TIME PCR.....	24
KONVENCIONALNI PCR.....	25
SEKVENCIRANJE CELOG GENOMA VIRUSA:.....	28
ANALIZA NUKLEOTIDNIH SEKVENCI:.....	28
PRIPREMA PRIMARNE KULTURE TKIVA OD ALVEOLARNIH MAKROFAGA SVINJA:	33
PRIPREMA PRIMARNE KULTURE TKIVA OD LEUKOCITA SVINJA.....	35
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA:	36
REZULTATI.....	37
FILOGENETSKA ANALIZA C-TERMINALNOG DELA B646L GENA KOJI KODIRA PROTEIN p72 VIRUSNOG KAPSIDA	40
FILOGENETSKA ANALIZA E183L GENA KOJI KODIRA STRUKTURNI PROTEIN p54 UNUTRAŠNJE MEMBRANE VIRUSA.....	42

FILOGENETSKA ANALIZA CVR UNUTAR B602L GENA KOJI KODIRA B602L FUZIONI PROTEIN	44
ANALIZA MUTACIJA B602L GENA KOJI KODIRA B602L FUZIONI PROTEIN	44
ANALIZA MUTACIJA INTERGENSKE REGIJE IZMEĐU I73R i I329L GENA	47
FILOGENETSKA ANALIZA CELIH GENOMA	49
ANALIZA SEKVENCI CELOG GENOMA VIRUSA AKS	51
REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA AKS NA PRIMARNOJ KULTURI TKIVA POREKLOM OD ALVEOLARNIH MAKROFAGA SVINJA.....	55
REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA AKS NA PRIMARNOJ KULTURI TKIVA POREKLOM OD LEUKOCITA SVINJA	57
PROSTORNO VREMENSKA ANALIZA POZITIVNIH UZORAKA POREKLOM OD DIVLJIH SVINJA OD 2020. DO 2023. GODINE.....	59
DISKUSIJA.....	62
EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA AKS.....	62
KLASIFIKACIJA SOJEVA NA OSNOVU ANALIZE GENSKIH MARKERA	63
ANALIZA PROMENA U CELOM GENOMU SOJEVA VIRUSA AKS	65
1. ACD grupa gena.....	65
2. NP1450L.....	66
3. ECO2.....	67
4. O174L.....	67
5. K145R.....	68
6. L60L.....	68
7. MGF.....	68
ZAKLJUČCI.....	72
LITERATURA.....	73

Kratak sadržaj

Ova studija predstavlja prvi sveobuhvatan izveštaj o molekularnim karakteristikama sojeva virusa afričke kuge svinja (AKS) u Srbiji u periodu od 2019. do 2023. godine. Od prvog izbijanja bolesti u julu 2019. godine, bolest je registrovana kod divljih i domaćih svinja što je dovelo do smanjenja broja svinja u Srbiji za više od 19,7 %. U ovoj studiji, izvršena je molekularna analiza 95 sojeva virusa afričke kuge svinja iz 12 upravnih okruga u kojima je potvrđena bolest. Sekvenciranje je obuhvatilo četiri genska markera: B646L, E183L, B602L, i intergensku regiju (IGR) između gena I73R-I329L. Pored toga, izvršeno je i sekvenciranje celog genoma pet sojeva uključujući one koji su izazvali pojavu bolesti 2019. godine. Na primarnim kulturama tkiva poreklom od alveolarnih makrofaga i leukocita svinja, izvršena je izolacija virusa i to na primarnim leukocitima je uspešnost izolacije iznosila 72,7 %, dok je na alveolarnim makrofagama svinja iznosila 91,3 %. Prostorno-vremenskom analizom pojave AKS kod divljih svinja u periodu od 2020. do 2023. godine otkriveno je postojanje pet klastera, dva u periodu 2020-2021, jedan u 2022, i dva u 2023. godini. Svi analizirani sojevi virusa AKS iz perioda 2019-2023. pripadaju genotipu II. Na osnovu analize nukleotidnih sekvenci srpskih sojeva utvrđeno je postojanje više podgrupa, kao i dve linije na osnovu CVR B602L gena od kojih je jedna identična sa referentnim sojem iz Gruzije, a druga sa mutacijom T318A. Takođe, po prvi put u Srbiji je identifikovana dominantna IGR II, kao i IGR III linija. Sekvenciranjem celih genoma virusa AKS ustanovljene su značajne mutacije u genima NP1450L, ECO2, O174L, K145R, MGF, grupi gena ACD, kao i delecija u genu L60L. Svi izolovani virusi su pokazali efekat hemadsorpcije i klasifikovani su u istu serogrupu kao i referentni soj Georgia 2007/1. Retrospektivnom analizom utvrđeno je da su dva nezavisna izbijanja AKS u 2019. godini proistekla iz različitih izvora, što dodatno ukazuje na složenost situacije i potrebu za nastavkom istraživanja radi boljeg razumevanja i kontrole širenja bolesti.

Ključne reči: Afrička kuga svinja, Srbija, molekularna karakterizacija, genotip II, B646L gen, E183L gen, IGR region, hemadsorpcijski efekat, genomske mutacije, epizootiološki klasteri

Abstract

This study presents the first comprehensive report on the molecular characteristics of African Swine Fever Virus (ASFV) strains in Serbia during the period from 2019 to 2023. Since its first occurrence in July 2019, the disease has been detected in both wild and domestic pigs, leading to a reduction of the pig population in Serbia by more than 19,7 %. The study involved molecular analysis of 95 positive samples collected from 12 infected administrative districts. Sequencing covered four genetic markers: B646L, E183L, B602L, and the intergenic region (IGR) between the I73R and I329L genes. Additionally, whole-genome sequencing of five strains, including those responsible for the outbreak in 2019, was conducted. Virus isolation was performed on primary tissue cultures originating from alveolar macrophages and leukocytes of pigs, with successful isolation with 71.7 % on primary leukocytes and 92.3 % on primary alveolar macrophages assessed based on the hemadsorption effect. Spatial-temporal analysis of ASFV in wild pigs during the research period from 2020 to 2023 revealed the existence of five clusters, with two in the period 2020-2021, one in 2022, and two in 2023. All analyzed ASFV strains from the period 2019-2023 belong to genotype II. Nucleotide sequence analysis of Serbian strains revealed the existence of multiple subgroups, including two lines of the CVR B602L gene, one identical to the reference strain from Georgia, and another with the T318A mutation. The dominant IGR II line and the IGR III line, identified for the first time in Serbia, were also observed. Whole-genome sequencing of ASFV identified significant mutations in the NP1450L, ECO2, O174L, K145R, MGF, ACD gene group, as well as a deletion in the L60L gene, in addition to 10 insignificant mutations. All isolates demonstrated the hemadsorption effect and were classified in the same serogroup as the reference strain Georgia 2007/1. Retrospective analysis confirmed that two independent ASF outbreaks in 2019 originated from different sources, highlighting the complexity of the situation and the need for continued research to better understand and control the spread of the disease.

Keywords: African Swine Fever, Serbia, Molecular Characterization, Genotype II, B646L gene, E183L gene, IGR region, Hemadsorption Effect, Genomic Mutations, Epizootiological Clusters

UVOD

Značajne ekonomske posledice koje izazivaju bolesti životinja, a posebno bolesti koje ne poznaju granice (*Transboundary animal diseases*, TADs, eng.) odražavaju se na nivou pojedinačnih farmi, ali i na regionalnom i nacionalnom ekonomskom planu. Ove posledice su uslovljene gubicima u proizvodnji životinja i visokim izdacima za mere prevencije, kontrole i eradikacije ovih bolesti. Pojava TADs nosi sa sobom ne samo ekonomske, već i ozbiljne socijalne posledice. Ove posledice su posebno izražene u malim poljoprivrednim gazdinstvima u zemljama u razvoju gde takve bolesti dovode do smanjenja ekonomske moći. U dugoročnoj perspektivi, suočavanje sa takvim bolestima može primorati ljude da napuste stočarstvo i potraže alternativne izvore prihoda. Pojava ovih bolesti izaziva zabrinutost za bezbednost hrane i može dovesti do smanjenja potrošnje proizvoda životinjskog porekla što utiče i na druge aktere u lancu snabdevanja uključujući trgovce, zaposlene u klanicama i prodavce.

Afrička kuga svinja (AKS) predstavlja trenutno najveću pretnju za svinjarstvo u svetu. U toku je panzootija afričke kuge uzrokovana genotipom II koji se od 2007. godine proširio na pet kontinenta i koji je prijavljen u 73 države.

Afrička kuga svinja je perakutno do hronično oboljenje domaćih (*Sus Scrofa domestica*) i divljih svinja (*Sus Scrofa*) visokog stepena letaliteta.

Negativni uticaji AKS na zdravlje i dobrobit životinja kao i na socio-ekonomske prilike, nametnuli su potrebu za boljim i sveobuhvatnijim razumevanjem prirode ove bolesti, u specifičnim lokalnim uslovima koje karakteriše veliki broj malih gazdinstava loše biosigurnosti, koja ni na koji način ne sprečavaju širenje virusa već naprotiv, doprinose. Najveći rizik za pojavu bolesti postoji na malim gazdinstvima gde nije moguće uspostaviti adekvatne biosigurnosne mere. Države koje su pretrpele najznačajniju ekonomsku štetu nakon pojave bolesti su one kod kojih je najveći deo proizvodnje svinja baziran na malim gazdinstvima kao što su Vijetnam sa 77 % i Kina sa preko 50 %. Samo u Vijetnamu je 2019. godine eutanazirano ili prinudno zaklano 6 miliona svinja usled pojave AKS. U Kini, najvećem proizvođaču svinjskog mesa na svetu je za period 2018-2019. godine procenjena ekonomska šteta od 111 miliona dolara tj. 0,78 % bruto domaćeg proizvoda. U Evropskoj uniji, ekonomske štete se uglavnom predstavljaju kroz smanjenje izvoza svinjskog mesa za 15 %, proizvodnje za 4 % u godini nakon izbijanja zaraze, i smanjenje stočnog fonda za 3-4 %. Proizvodnja svinjskog mesa u Srbiji učestvuje sa 57,6 % ukupne proizvodnje mesa. Prema rezultatima popisa poljoprivrednih gazdinstava, svinje se uzgajaju na 355000 farmi od kojih je 39,8 % malih domaćinstava na kojima se drži tri do devet svinja. Zbog primene mera za kontrolu ove bolesti koje podrazumevaju ubijanje zaraženih svinja i preventivnu depopulaciju u kontaktnim dvorištima, uzgajivači dobijaju 100% nadoknadu štete. Prosečna vrednost naknade za jednu krmaču/nerasta u 2019. i 2020. godini bila je oko 350 €, cena dezinfekcije je bila 0,17 €/m², eutanazije svinje oko 8,5 €, a neškodljivog uklanjanja u kafileriji oko 0,14 €/kg.

Afričku kugu svinja uzrokuje istoimeni virus iz familije *Asfarviridae* i roda *Asfivirus*. Virus AKS je građen od dvolančane DNK koja čini nukleoproteinsko jezgro oko kojeg se nalaze unutrašnji omotač, ikosaedarni kapsid i spoljašnji lipidni omotač. Virusi AKS se klasifikuju u 24 genotipa (I-XXIV).

Klinički znaci bolesti zavise od genotipa, soja i virulentnosti virusa, infektivne doze i načina nastanka infekcije kao i karakteristika samog domaćina. Opisana su četiri toka bolesti: perakutni, akutni, supakutni i hronični. Do sada su opisani visoko-virulentni sojevi virusa koje karakteriše perakutni ili akutni tok, sa povišenom telesnom temperaturom (40-42 °C), letargijom, anoreksijom, dijarejom, pobačajima kod gravidnih krmača, krvarenjima po koži i posledičnim uginućima. Supakutni tok izazivaju manje virulentni sojevi koji su detektovani u Estoniji, Litvaniji i Poljskoj, uglavnom kod divljih svinja, i karakteriše ga pojava blažih kliničkih znakova sa letalitetom između 30 % i 70 %. Hronična forma bolesti je vrlo retka, a karakteriše se multifokalnim nekrozama po koži, artritisom, pobačajem, hroničnim mršavljenjem, poremećajima u rastu i respiratornim promenama.

Dijagnostika AKS se vrši direktno dokazivanjem virusa ili njegovih strukturnih delova (antigena, genoma) klasičnim virusološkim i molekularnim metodama i indirektno, dokazivanjem humoralnog imunološkog odgovora primenom seroloških metoda. Izolacija virusa AKS se vrši na primarnoj kulturi tkiva kao što su leukociti ili makrofagi svinja i pojedinim kontinuiranim ćelijskim linijama kao što su MA-104 ili VERO. . Ipak, molekularna dijagnostika predstavlja metodologiju izbora jer omogućava precizno i brzo otkrivanje specifičnih genskih sekvenci virusa.

Serološke metode imaju ograničenu upotrebu u dijagnostici, imajući u vidu brz tok bolesti. Međutim, od suštinskog značaja su za otkrivanje preživelih jedinki.

Trenutno ne postoji registrovana vakcina u Evropi protiv virusa AKS, te se kontrola širenja bolesti zasniva na primeni dobrih biosigurnostih mera i kontroli prometa životinja i namirnica animalnog porekla kao i neškodljivim uklanjanjem inficiranih domaćih svinja i leševa divljih svinja.

Afrička kuga svinja je prvi put otkrivena u Srbiji 28. jula 2019. godine u selu Rabrovac-Šume, opština Mladenovac. Na osnovu epizootiološke analize utvrđeno je da je virus unet kontaminiranim proizvodima animalnog porekla u kojima je registrovana zaraza. U januaru 2020. godine, AKS je po prvi put dijagnostikovana kod divljih svinja u Srbiji u zaječarskom okrugu. Do juna 2023. godine prijavljeno je 474 žarišta u populaciji divljih svinja i 436 slučajeva kod domaćih svinja. Najveća ekspanzija bolesti je zabeležena od početka 2023. godine kada je za 11 meseci prijavljeno 762 žarišta kod domaćih svinja i 198 slučajeva kod divljih svinja.

Na osnovu podataka Republičkog zavoda za statistiku Srbije, broj svinja u Srbiji se od 1. decembra 2019. godine do 1. decembra 2023. godine smanjio za 19,7 %. Prema popisu poljoprivrede iz 2023. godine čak 61,7 % od ukupnog broja gazdinstava se bavi stočarstvom. Ocena biosigurnosnih mera na malim gazdinstvima, sprovedena na osnovu programa aktivnog nadzora Uprave za veterinu, bila je vrlo niska.

Budući da su sve osobine virusa zapisane u genomu, molekularna epizootiologija treba da da odgovore na pitanja odakle je virus AKS unesen u našu zemlju, kako se menja i evoluira. Ovi podaci pružiće dragocene podatke o dinamici i kontroli AKS u regionu, i doprineti razvoju efikasnijih strategija prevencije i suzbijanja bolesti.

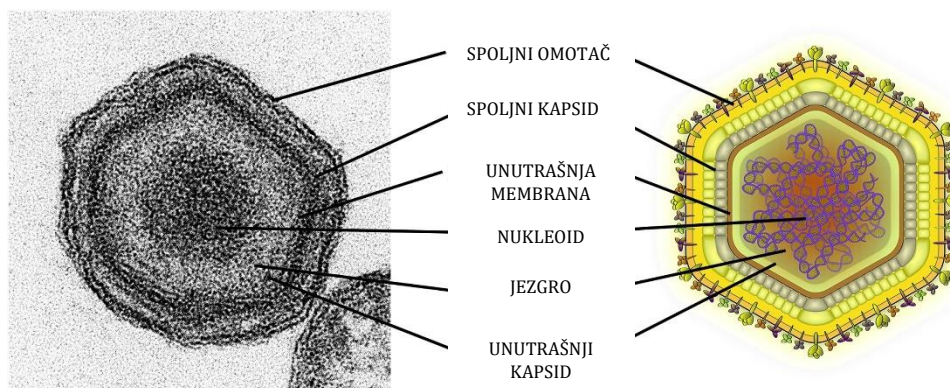
PREGLED LITERATURE

ETIOLOGIJA

O virusu

Građa virusa AKS

Virus AKS poseduje dvolančani linearni DNK (dsDNK) molekul dužine 170-190 kbp, pri čemu veličina genoma varira u zavisnosti od genotipa i podgenotipa i broja ponovljenih segmenata. Virus je klasifikovan u porodicu *Asfaviridae*, rod *Asfivirus* i jedini je DNK arbovirus (virusi koje prenose artropode-arthropod born virus, eng.) (Alonso i sar. 2018). Broj otvorenih okvira čitanja (*open reading frames-ORF*, eng.) varira od 151 do 167 u zavisnosti od genotipa (Dixon i sar. 2013). Na krajevima genoma se nalaze terminalne nekodirajuće ponovljenje sekvence (Blome i sar. 2020). Između nekodirajućih krajeva, nalazi se kodirajući deo genoma koji nosi informacije o sintezi preko 150 strukturnih i nestrukturnih proteina. Primenom elektronske mikroskopije oko DNK virusa se uočavaju dva jasno odvojena ikosaedarna kapsida sa 1892-2172 kapsomere, okružena lipidnim omotačem koji tako čine nukleokapsid virusa (Andrés i sar. 2020) (Slika 1.). Unutrašnji kapsid čini grupa poliproteina (pp) 220, pp 62 i p15. Spoljni kapsid čini 8300 kopija p72 proteina koji determiniše genotip virusa. Formiranje spoljašnjeg kapsida je omogućeno proteinima koji imaju ulogu molekularnih pratilaca, a koje kodira B602L gen (Liu i sar. 2019). U sastav ulaze i stabilizacioni proteini koji reaguju sa p72 (Blome i sar. 2020). Molekuli p72 se međusobno povezuju formirajući trimere visine i širine od približno 85 Å (Ångstrom, jedinica za dužinu, 10^{-10} m) (Liu i sar. 2019). Primenom elektronske mikroskopije, struktura trimera je dalje razjašnjena. Bazu p72 trimera formiraju monomerne jedinice u obliku žele rolne (eng. „jelly roll ili swiss roll fold“) tako da terminalni krajevi proteina čine pseudoheksagonalnu bazu p72 trimera. Jednu „jelly roll-swiss roll fold“ formiraju dve antiparalelne β -ploče pri čemu se svaka β -ploča sastoji od četiri antiparalelna β -lanca. Lanci se obeležavaju slovima latinice od B do L, tako da BIDG formira jednu β -ploču, a CHEF drugu. Između lanaca se nalaze insercije formirajući navoje, pri čemu se tri navoja nalaze na N terminalnom kraju (DE_N , FG_N , HI_N) i jedan navoj na C-terminalnom kraju (DE_C). β -2 lanci navoja DE_N , HI_N i DE_C formiraju „kapu“ p72 trimera, dok su sa bazom povezani preko β -1 lanca istih navoja (Liu i sar. 2019).



Slika 1. ADAPTACIJA IZ PUBLIKACIJE: "African swine fever – A review of current knowledge" Blome i sar. 2020.

Prilikom napuštanja ćelije domaćina, virus stiče lipidni omotač (Andrés i sar. 2020). Jedan od najznačajnijih proteina u lipidnom omotaču je pCDv2 kojeg kodira EP420R gen. To je

transmembranski protein sličan CD2 proteinu domaćina. Tačna funkcija pCDv2 nije u potpunosti poznata. CD2 dovodi do vezivanja eritrocita za površinu inficiranih makrofaga i pretpostavlja se da dovodi do vezivanja eritrocita za virione u krvi inficiranih životinja. Jedna od funkcija ovog virusnog proteina je verovatno i prenošenje proteina kroz Goldžijev aparat inficirane ćelije (Petrovan i sar. 2020). Analizom nukleotidnih sekvenci virusnog EP420R gena, utvrđen je visok stepen homologije sa genom za T limfocitni adhezioni molekul CD2. Funkcionalan pCDv2 je, takođe, neophodan za replikaciju u *Ornithodoros spp.* (Rowlands i sar. 2009). Proučavanjem atenuiranih i slabo virulentnih sojeva, primećeno je da kod njih dolazi do pojave skraćenih proteina (*truncated*, eng.) koji su nefunkcionalni (Karger i sar. 2019), usled čega se ispoljavanje efekta hemadsorpcije povezuje sa virulencijom soja. Takođe, kod svinja koje su vakcinisane sojem kome je deletiran EP420R gen postiže se niža viremija nakon veštačke infekcije visokovirulentnim sojem (Petrovan i sar. 2022). Sa unutrašnje strane lipidnog omotača nalazi se p54 protein koji kodira E183L gen. Protein čine 183 aminokiseline, od kojih 50 čini unutrašnji N terminalni kraj, a 133 C terminalni ektodomen. U okviru proteina postoje konzervirani i varijabilni domeni, pri čemu je varijabilnost vezana primarno za ponovljene segmente prolina i alanina (Pro-Ala-Ala-Ala) na C terminalnom kraju proteina. Analiza gena E183L je vrlo značajna za klasifikaciju podtipova u okviru jednog genotipa (Petrovan i sar. 2020). Najveća varijabilnost u E183L genu je zabeležena kod genotipova I, V, X, dok je u okviru genotipa II zabeležen samo jedan p54 podgenotip. P54 kao i p30 imaju ulogu u vezivanju virusa za receptore na prijemčivim ćelijama. Uz pomoć p54 i dineina se odvija transport virusa u perinuklearnu regiju ćelije (Petrovan i sar. 2020).

Jedan od značajnih nestrukturnih proteina je pB602L koji kodira B602L gen. Uloga pB602L proteina je vezana za formiranje kapsida virusa. Protein B602L ima ulogu molekularnog pratioca. Delecijom B602L gena dolazi do formiranja „*zipper-like*“ (rajsferšlus) formacija umesto tipičnih ikosaedralnih viriona. Ovakvim aberantnim formacijama nedostaju ili su smanjeni proteini kapsida (p72) kao i proteini koji se mogu pronaći sa unutrašnje strane lipidnog omotača (pE120R). Sa smanjenom aktivnošću pB602L dolazi i do pada broja kopija p72, verovatno usled nepravilnog savijanja p72 i njegove smanjene stabilnosti (Epifano i sar. 2006).

U ranoj fazi infekcije virusom AKS, I73R gen je najaktivniji. Ovaj gen je odgovoran za sintezu malog proteina (pI73R) koji u jedru suprimira informacionu RNK i time obustavlja proces sinteze proteina domaćina. Osim toga, ovaj faktor inhibira imunološke reakcije domaćina i podstiče replikaciju virusa. Zbog toga se smatra da je I73R od suštinskog značaja za patogenost virusa AKS (Liu i sar. 2023). Delecija I73R gena predstavlja obećavajuću opciju za razvoj atenuirane vakcine koja pokazuje dobar balans između biosigurnosti i efikasnog imunog odgovora (Liu i sar. 2023).

Virusni protein I329L kodira istoimeni gen koji je od I73R gena odvojen nekodirajućim intergenskim regionom (IGR) bogatim ponavljajućim segmentima. pI329L je transmembranski protein slične građe kao i Toll receptori (Reis i sar. 2020). U svom ekstracelularnom domenu poseduje četiri leucinom bogata ponovljena segmenta homologna sa ćelijskim Toll receptorom za interleukin 1 (IL-1). Na osnovu 3D analize proteinske strukture, pretpostavlja se da je antagonist toll receptora za IL-1. Infekcijom primarnih alveolarnih makrofaga autori Reis i sar. (2020) su detektovali smanjenu količinu produkovanog interferona I (IFN-I) usled nishodne regulacije receptora. Delecijom ovog gena, nisu zabeležene promene u virulenciji visokovirulentnih sojeva, osim ukoliko nije izvršena delecija i drugih gena značajnih za produkciju IFN-I (Reis i sar. 2020).

Genotipizacija virusa AKS

Genotipizacija i klasifikacija virusa u genotipove, podgenotipove, linije i sojeve se vrši na osnovu razlika u genomu (Rowlands i sar. 2008; Lange i sar. 2014). Najveći diverzitet virusa je karakterističan za Afriku gde su do sada detektovana 24 genotipa virusa. Pojava novih genotipova je usko povezana sa silvatičnim ciklusom i cirkulacijom virusa između krpelja i *Suida* (Blome i sar. 2020). Van granica Afrike do sada su detektovani genotipovi I i II (Gallardo i sar. 2023). Posmatrano u širem smislu, dsDNK je stabilnija i manje sklona spontanim mutacijama od ribonukleinske kisline (RNK) (Dixon i sar. 2020). Kada se posmatraju individualni geni virusa AKS, stopa mutacija varira, a prosečno iznosi 10^{-4} po nukleotidu godišnje što odgovara stopi mutacija RNK virusa (Malogolovkin i Kolbasov 2019). Filogenetske analize sugerišu da veliki značaj za genski diverzitet dsDNK virusa imaju genske rekombinacije. Pronalazak većeg broja insercija, delecija i tačkastih mutacija u genomu AKS, sugeriše da one mogu biti rezultat homolognih rekombinacija i retropozicioniranja. Rekombinantna varijabilna mesta dešifrovana su u genima koji kodiraju transmembranski protein tipa I spoljašnjeg omotača virusa, EP402R (CDvs), strukturni protein E183R (p54), u genima koji između ostalog dovode do inhibicije stvaranja interferona I MGF (*multiple gene family*, eng.), X64R i EP152R (Malogolovkin i Kolbasov 2019; Faburay 2022). U drugim delovima genoma dominira indel tip mutacija, kao što je slučaj kod nestrukturnog fuzionog proteina B602L gena, razni intergenski regioni (između gena I73R i I329L, I329L i I215L), zatim tačkaste mutacije u delovima genoma O174L (PolX gen) i K145R (Malogolovkin i Kolbasov 2019; Blome i sar. 2020; Faburay 2022; Forth i sar. 2023; Gallardo i sar. 2023). Tako su definisani genski markeri odnosno delovi genoma koji najčešće podležu promenama i koje je neophodno pratiti za bližu karakterizaciju sojeva.

Genotipizacija virusa AKS se vrši na osnovu analize p72 proteina virusnog kapsida koga kodira B646L gena (Bastos i sar. 2003; Boshoff i sar. 2007), ali budući da su genotipovi vrlo homogeni, dalja diferencijacija na osnovu ovog gena nije moguća. U okviru istraživanja iz 2009. godine (Gallardo i sar. 2009) ispitana je mogućnost upotrebe E183L i B602L gena za dalje razlikovanje sojeva unutar jednog genotipa. Ustanovljeno je da je na osnovu analize E183L gena moguće razlikovanje podgenotipova unutar genotipova I, V, X i XX. Međutim, pojedini genotipovi su izrazito homogeni, kao što je genotip II, usled čega dalja diferencijacija nije moguća na ovaj način. Ipak, analizom B602L gena unutar genotipa II, moguće je razlikovanje dva podgenotipa: CVR 1 kojeg karakteriše deset ponovljenih aminokiselinskih nizova (BNDBNDBNAA) i CVR 2 kojeg karakteriše delecija kodona koji kodiraju aminokiselinski niz CASMCADTNVDT (Vilem i sar. 2020). Dodatna diferencijacija je moguća analizom polimorfizma jednog nukleotida unutar CVR podgenotipa (Gallardo i sar. 2023). Promene na nivou jednog nukleotida unutar B602L gena su zabeležene u Estoniji, Litvaniji, Poljskoj, Rusiji i Kini (Gallardo i sar. 2023) i omogućavaju diferencijaciju sojeva unutar genotipa II podgenotipa CVR 1. Analiza evropskih sojeva virusa AKS genotipa II vršena je i praćenjem promena na nivou intergenskih regiona (IGR) između gena I73R i I329L (Gallardo i sar. 2014). Najveći deo IGR predstavljaju ponovljene nekodirajuće sekvence koje se karakterišu većom stopom mutacije. Analizom „TATATAGGAA“ ponovljenih segmenata moguće je razlikovati četiri IGR podgenotipa (IGR I-IV) od kojih su svi detektovani u Evropi. Najzastupljeniji podgenotip je IGR II koji je prvi put detektovan kod sojeva iz Rusije iz 2012. godine, zamenivši do tada najzastupljeniji gruzijski 2007/1 soj. Istovremena cirkulacija sva četiri podgenotipa je do sada detektovana samo u Poljskoj. Pored toga, jedino je u Poljskoj u blizini granice sa Rusijom (Kaliningradska oblast) detektovan podgenotip IV (Mazur-Panasiuk i sar. 2020). Podgenotipovi I i III su zabeleženi u Poljskoj, Rusiji,

Kini, Vijetnamu i Južnoj Koreji uglavnom kao izolovani slučajevi (Gallardo i sar. 2023). Sekvenciranjem celog genoma poljskih izolata, Mazur-Panasiuk i sar. (2019) su detektovali pet varijanti virusa unutar gena MGF: MGF 110-7 L, MGF 505-5 R, K145R, I267L i DP60R koji su jedinstveni za njihove izolate i pružaju dokaze o konstantnoj evoluciji virusa. Autori Mazloun i sar. (2021) su komparativnom analizom celih genoma ruskih izolata virusa AKS ustanovili geografske karakteristike izolata i time pružili uvid u moguću evoluciju virusa. Autori J. H. Forth i sar. (2023) su sekvenciranjem celog genoma utvrdili postojanje mutacije u genu O174L koji kodira sintezu polimeraze X usled čega je zabeležen veći broj varijanti virusa u Nemačkoj u toku 2020. godine. Na osnovu sekvenciranja celog genoma J. H. Forth i sar. (2023) su po prvi put pokazali da je moguće praćenje lokalnih varijanti virusa. Sekvenciranjem celog genoma dobijaju se informacije o reorganizaciji različitih delova genoma virusa, insercijama i delecijama.

U genomskoj analizi mekih krpelja (*Ornithodoros spp.*) otkriveni su fragmenti gena virusa AKS locirani u blizini visoko-mobilnih genskih segmenata. Kroz praćenje mobilnih genskih segmenata i njihovih hipervarijabilnih regija, identifikovani su integrisani genski elementi koji pokazuju sličnost sa segmentima gena virusa AKS (Forth i sar. 2020). Analizom molekularnog sata na osnovu AKS-sličnog EP1242L gena pronađenog kod *O. porcinus* i *O. moubata* pretpostavlja se da se integracija dogodila najdalje pre 4,29 miliona godina (Forth i sar. 2020). Identifikovano je 46 gena homologih virusu AKS u genomu krpelja, uglavnom vezanih za replikaciju i transkripciju. Na osnovu komparativne analize genoma *O. moubata* i virusa AKS, naučnici su došli do zaključka da se skoro 10 % genoma virusa AKS podudara sa genomom vektora (Forth i sar. 2020).

Otpornost

Virus AKS je izuzetno otporan u spoljašnjoj sredini. Virus preživljava više od tri dana u kontaminiranim prostorima i do nekoliko nedelja u svinjskom izmetu. Na sobnoj temperaturi, virus opstaje u serumu i krvi do 18 meseci. U zamrznutom ili sirovom mesu, virus opstaje i do 1000 dana (Sánchez-Vizcaíno i sar., 2019). Nakon obrade, npr. u parmskoj pršuti, virus AKS opstaje do 300 dana, dok su španskim svinjskim proizvodima opstaje do 140. dana. Nije bilo detekcije živog AKS-a u termički obrađenim proizvodima zagrejanim na 70 °C (Sánchez-Vizcaíno i sar., 2019).

Virus AKS pokazuje značajnu izdržljivost na niskim temperaturama. Međutim, virus je osetljiv pri ekstremnim pH vrednostima, naročito ispod 3,9 ili iznad 11,5, bez prisustva seruma. Zapaženo je da serum pruža određenu zaštitu virusu, omogućavajući mu da ostane aktivan do 21 dan pri pH vrednosti od 13,4. Za efektivno uništavanje virusa afričke kuge svinja u mesu, potrebno je meso obraditi na temperaturi od 70 °C u trajanju od minimalno 30 minuta. Istraživanja su dodatno pokazala da 30 minuta tretiranja na 60 °C adekvatno inaktivira virus u serumu i ostalim telesnim tečnostima. Detaljni podaci o vremenskim okvirima preživljavanja virusa AKS u raznim uslovima dostupni su u tabelama 1 i 2 (Ministarstvo poljoprivrede 2018).

Za dezinfekciju prostora i površina, moguće je koristiti različita sredstva. Na primer, 0,8 % rastvor natrijum-hidroksida (NaOH) delotvoran je tokom 30 minuta, kao i 0,3 % rastvor formalina za isto vreme. Takođe, efikasan je i 3 % rastvor orto-fenilfenola. Sredstva koja sadrže hipohlorit, poput 2,3 % rastvora hlorina, pokazala su se uspešnim u periodu od 30 minuta. Za čišćenje neporoznih površina preporučuje se upotreba natrijum-hipohlorita (ili varikine), 1 % rastvora limunske kiseline, jodnih preparata i kvaternarnih amonijumovih jedinjenja. Rastvor od 2 % limunske kiseline ili 2000 ppm natrijum hipohlorita efikasni su za dezinfekciju drvenih površina. Efikasna dezinfekcija osoke se može postići korišćenjem 1 % NaOH ili Ca(OH)₂ na 4

°C u trajanju od jednog minuta, ili 0,5 % NaOH ili Ca(OH)₂ tokom 30 minuta. Tretman od jednog sata s 1 % rastvorom orto-fenilfenola je uspešan u eliminisanju virusa AKS (Ministarstvo poljoprivrede 2018).

Tabela 1. Preživljavanje virusa AKS u raznim uslovima sredine

<i>Preživljavanje virusa AKS u raznim uslovima</i>	
Medijum bez seruma na 50 °C	3 sata
Medijum bez seruma na 56 °C	70 minuta
Medijum bez seruma na 60 °C	20 minuta
Krv na 4 °C	18 meseci
Krv na drvenim površinama	70 dana
Feces na 18 – 25 °C, u mraku	11 dana
Urin na 37 °C	3 dana
Urin na 4 °C	15 dana
Krv	15 sedmica
Kontaminirani -objekti	1 mesec
Osoka na 65 °C	1 mesec
Zaleđeni leševi	Nekoliko

Tabela 2: Vreme preživljavanja virusa AKS u raznim proizvodima od mesa

<i>Preživljavanje virusa AKS u raznim proizvodima od mesa (u danima)</i>	
Meso sa/bez kostiju i mleveno meso	105
Usoljeno meso sa/bez kostiju	182
Kuvano meso 30 min na 70 °C	0
Konzerve	0
Suvo meso sa/bez kostiju	300
Dimljeno otktošteno meso	30
Smrznuto meso	1000
Ohlađeno meso	110
Iberijska pršuta	140
Parmska pršuta	183
Iznutrice	105
Koža/mast	300

EPIZOOTIOLOGIJA

Geografska rasprostranjenost

Istorijski podaci

Montgomeri je 1921. godine prvi otkrio AKS opisujući slučajeve iz 1910. godine u britanskom protektoratu istočne Afrike (današnja Kenija). Bolest se ispoljila kod domaćih, uvezenih rasa svinja u vidu cijanoze ušiju, odbijanja uzimanja hrane, teškog hodanja, visoke temperature i uginuća 48 časova od pojave prvih kliničkih znakova (Eustace Montgomery 1921). Opisane su slične promene i kod autohtonih rasa svinja, ali u značajno blažoj formi. Tada se smatralo da su domorodačke domaće svinje bile izvor infekcije za evropske rase svinja (Penrith i sar. 2013).

Nakon prvog Montgomerijevog opisa, novootkrivena bolest je povezivana sa poznatim uzročnikom crvenog vetra (*Erysipelothrix rhusiopathiae*). Uprkos ranom opisu, tek je 1943. godine dokazano da je uzročnik AKS virus (Penrith i sar., 2013). Međutim, interesovanje naučne zajednice za virus AKS počinje krajem 50-tih godina prošlog veka, nakon pojave bolesti na Pirinejskom poluostrvu (Penrith i sar., 2013).

Širenje AKS u Africi tokom dvadesetog veka

Tokom 50-ih godina prošlog veka, zabeležena je pojava novih slučajeva AKS u zemljama zapadne Afrike. Bolest se kontinuirano širila prema zapadu i u relativno kratkom vremenskom periodu, AKS je bila prijavljena u većini zemalja supsaharske Afrike (Penrith i sar., 2013). Tokom 60-ih godina, pojava AKS zabeležena je u Malaviju i Mozambiku. Do sredine 70-ih godina, virus AKS-a je bio identifikovan i prijavljen u većini zemalja istočne i južne Afrike, prema studiji koju su sprovedi Penrith i saradnici (2013). Iako prva zvanično registrovana pojava virusa u istočnoj Africi datira iz 1978. godine u Senegal, postoji indicija da je virus i ranije cirkulisao u populaciji svinja. Ova pretpostavka je podržana izolacijom virusa AKS iz uzoraka koji su prikupljeni 1959. godine u Senegal (Bastos i sar. 2003). Nakon toga, pojava AKS bila je zabeležena u Kamerunu tokom 1982. i 1985. godine. U toku 90-ih, bolest je dijagnostikovana u nizu zemalja supsaharske Afrike. Obala Slonovače je prijavila slučajeve 1996. godine, dok su Benin, Nigerija, Burkina Faso, Gana, Senegal, Gambija, Madagaskar i Zelenortska ostrva beležili prisustvo bolesti u periodu od 1997. do 2003. godine. Po poslednjem izveštaju Svetske organizacije za zdravlje životinja (*World Organisation for Animal Health - WOAH*) u momentu pisanja ove disertacije, AKS je prijavljena u istočnoj Africi u Nigeriji, Obali Slonovače, Kongu, zatim u zapadnoj Africi u Mozambiku, Tanzaniji, Keniji, Malaviju, Zambiji i na jugu u Južnoafričkoj Republici, Namibiji i Bocvani (World Organisation for Animal Health 2023).

Širenje AKS u Evropi tokom dvadesetog veka

Prva pojava AKS van afričkog kontinenta je zabeležena u Portugaliji 1957. godine. Epizootiološka ispitivanja su pokazala da je bolest najverovatnije unesena u zemlju ostacima hrane iz aviona u blizini aerodroma u Lisabonu (Costard i sar. 2009). Ubrzo nakon suzbijanja ovog žariša došlo je do druge pojave AKS 1960. godine i širenja bolesti po celom Pirinejskom poluostrvu (Penrith i sar. 2013; Muñoz-Pérez i sar. 2022). Posle 35 godina eradikacija bolesti je uspešno završena 1995. godine (Muñoz-Pérez i sar., 2022). Otkriveno je da se bolest ne prenosi direktno sa obolele na zdravu životinju, već da je za prenos potreban posrednik, odnosno vektor (Sanchez 1963). Prvi vektor je otkriven u Španiji proučavanjem krpelja vrste *Ornitodoros erraticus* (Sanchez, 1963). Istraživanjem staništa gde divlje svinje borave u Nacionalnom parku Serengeti u Tanzaniji, pronađeni su krpelji vrste *O. moubata* i prepoznati

su kao glavni vektori i rezervoari virusa u prirodi na teritoriji Afrike (Plowright i sar. 1969). Ovi nalazi potvrđeni su deset godina kasnije u Malaviju gde je otkrivena infekcija svinja virusom AKS iako nije bilo prethodnog kontakta sa divljim svinjama, a pronađen je i veliki broj krpelja vrste *O. moubata* (Haresnape i Mamu 1986; Haresnape i sar. 1988). Francuska prijavljuje AKS 1964, 1967. i 1977. godine, Italija 1967. i 1980. godine, Malta 1978. godine, Belgija 1985. godine i Holandija 1986. godine (Plowright i sar. 1994). Pretpostavlja se da je usled izbijanja zaraze u Portugaliji skoro 20000 svinja uginulo ili eutanazirano (Zhang i sar. 2023b). Svi slučajevi AKS genotipa I su eradikovani u Evropi, osim na Sardiniji, gde se do danas virus održao u populaciji divljih svinja (Danzetta i sar. 2020).

Genotip II – trenutna panzootija počevši od 2007. godine do sada

Trenutna panzootija AKS je počela 2007. godine kada je bolest potvrđena u Gruziji (Rowlands i sar. 2008; Lange i sar. 2014). Opšteprihvaćena pretpostavka je da je virus, najbližnji sojevima iz Mozambika i Madagaskara (Rowlands i sar., 2008), unet preko kontaminiranih pomija preko luke Poti na obali Crnog Mora (Gogin i sar. 2013; Lange i sar. 2014). Kasnije, iste godine, virus je detektovan u Južnoj Osetiji, Jermeniji i Azerbejdžanu. Uginule divlje svinje su pronađene krajem godine na Kavkazu na jugu Rusije (Gogin i sar. 2013; Koeltz i sar. 2018). Početkom 2008. godine zabeleženi su i prvi slučajevi infekcije domaćih svinja virusom AKS u Rusiji. Tokom naredne četiri godine, virus je cirkulisao u populaciji divljih i domaćih svinja na prostorima jugozapadne Rusije, sve do 2012. godine kada je zabeležen prvi slučaj AKS u Ukrajini (Cwynar i sar. 2019). Prvi slučaj je zabeležen na malom gazdinstvu kod domaćih svinja, dok je drugi slučaj zabeležen kod divljih svinja, svega godinu dana kasnije (Sánchez-Vizcaíno i sar. 2015; Cwynar i sar. 2019). Sredinom 2013. godine prvi slučajevi AKS su zabeleženi u Belorusiji, a početkom 2014. godine i u Litvaniji (Sánchez-Vizcaíno i sar. 2015; Cwynar i sar. 2019). Nekoliko meseci kasnije, AKS je zabeležena i u drugim Baltičkim državama (Letoniji i Estoniji) i Poljskoj (Gallardo i sar. 2014; Woźniakowski i sar. 2021). Nakon tri godine relativne stabilizacije, novi talas širenja bolesti je zabeležen 2017. godine sa prvim slučajevima AKS u Rumuniji i Češkoj Republici, zatim 2018. godine u Mađarskoj, Bugarskoj, Moldaviji i Belgiji (Cwynar i sar. 2019; Gallardo i sar. 2023). Češka Republika i Belgija su jedine države u Evropi koje su uspele uspešno da eradikuju AKS kod divljih svinja. Međutim, krajem 2022. godine zabeležen je novi slučaj AKS kod divlje svinje u Češkoj Republici (WOAH 2022). Prvi slučaj AKS u Srbiji je registrovan 2019. godine (Milićević i sar. 2019). Naredne godine, prisustvo virusa je prvi put potvrđeno na jednom malom gazdinstvu u Grčkoj (Brellou i sar. 2021). Brzom reakcijom nadležnih vlasti, žarište je ugašeno i u Grčkoj nije zabeležen ni jedan slučaj AKS kod divljih svinja sve do 20. januara 2023. godine. Prvi slučaj genotipa II virusa AKS je zabeležen u kontinentalnom delu Italije 2022. godine (Iscaro i sar. 2022). Prvi slučajevi virusa AKS su 2023. godine zabeleženi u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, a početkom 2024. godine i kod divljih svinja u Crnoj Gori (European Commission: Animal Disease Information System 2024).

Prijemčive vrste

Prijemčive vrste u Africi za virus ASK su divlje afričke svinje (bradavičasta svinja *Phacochoerus africanus*, pustinjska bradavičasta svinja *Phacochoerus aethiopicus* i rečna svinja *Potamochoerus larvatus*) i domaće svinje, dok su to u Evroaziji divlja svinja (*Sus scrofa*) i domaća svinja (*Sus scrofa domesticus*), ali se smatra se da je pravi domaćin virusa krpelj (Pautienius i sar. 2018).

Prenošenje virusa

U epizootiološkom kontekstu razlikuju se četiri načina cirkulacije virusa i to:

1. Silvatični ciklus koji podrazumeva prenošenje virusa sa inficiranih krpelja na afričke divlje svinje.
2. Cirkulacija virusa u populaciji domaćih svinja bez prisustva kompetentnih vektora.
3. Cirkulacija virusa između divljih i domaćih svinja.
4. Cirkulacija virusa kod divljih svinja.

Silvatični ciklus

Krpelji iz roda *Ornithodoros spp.* su prvi put okarakterisani kao vektori virusa AKS 1969. godine od strane istraživača Plowright i sar. kada su pronađeni u brlogu obolelih divljih svinja. Najznačajniji predstavnik ovog roda je *O. moubata s.l.* koji se pronalazi u istočnoj i južnoj Africi. Postoji veći broj *O. moubata* vrsta koji se svi nazivaju jednim imenom *O. moubata complex*. Ovi krpelji se fenotipski ne mogu razlikovati. Provode manje od sat vremena hraneći se i većinu života provode na domaćinu ili u skrovištu domaćina (Jori i sar. 2023). Virus se kod krpelja prenosi transstadijalnim, transovarijalnim i seksualnim putem tj. virus se može održati u populaciji krpelja bez prisustva pravog domaćina, vrsta roda *Suidae* (Jori i sar., 2023). Primarna infekcija krpelja nastaje hranjenjem na viremičnom pravom domaćinu, ili vertikalnim putem. Kod inficiranih krpelja je zabeležen period eklipse koji u proseku iznosi 7-14 dana. Autori Kleiboeker i sar. (1998) opisuju vrlo nisku infektivnu dozu virusa $0,9-4 \log_{10} \text{HAD}_{50}$ za krpelje *O. porcinus porcinus*. U istoj studiji, autori opisuju značajan rast titra virusa u krpeljima koji nakon 7-14 dana iznosi $6 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mg}$ težine krpelja. Visoki titar koji se održava godinu dana, omogućava infekciju svinja čak i do 469 dana nakon infekcije krpelja (Kleiboeker i sar. 1998; Kleiboeker i Scoles 2001). Autori Boinas i sar. (2011) su uspešno inficirali svinje vrstama krpelja *O. erraticus* 380 dana posle infekcije krpelja. Takođe, autori Boinas i sar. (2011) sugerišu da *O. erraticus* može predstavljati dugotrajan izvor infekcije, s obzirom na to da velike nimfe i adulti mogu preživeti bez obroka pet godina, a da životni vek mekih krpelja može da iznosi 15-20 godina (Boinas i sar. 2011).

Ultrastrukturnim analizama različitih tkiva eksperimentalno inficiranih krpelja Chiredzi/83/1 sojem virusa AKS, autori Kleiboeker i sar. (1998) su pokazali da se primarna replikacija virusa odvija u fagocitima srednjeg creva krpelja, a da do generalizacije dolazi već 15 dana po infekciji. Nakon primarne replikacije, virus prodire kroz bazalnu laminu srednjeg creva u hemocel i širi se po organizmu. Sekundarna replikacija se odvija u hemocelu, pljuvačnim žlezdama, koksalnim žlezdama, vezivnom i reproduktivnom tkivu (Kleiboeker i sar., 1998; Kleiboeker & Scoles, 2001). Prisustvo virusa je dokazano u svim inficiranim tkivima krpelja. Replikacija virusa zavisi od prijemčivosti ćelija srednjeg creva na soj virusa AKS, zbog čega se neki sojevi virusa AKS ne replikuju u krpeljima. Autori Kleiboeker i sar. (1998) su izvršili eksperimentalnu infekciju *O. porcinus* sojem Malawi Lil20/1 AKS i pokazali, da se pomenuti soj ne umnožava u ćelijama srednjeg creva niti je moguća njegova transmisija između krpelja, a ni između krpelja i svinja. Kod odraslih krpelja i inficiranih nimfi nije uočen porast mortaliteta, uprkos dugotrajnoj replikaciji virusa u ćelijama srednjeg creva krpelja (Kleiboeker & Scoles, 2001). Virus se sa krpelja na svinje prenosi preko salivarnih i koksalnih žlezda krpelja. Pretpostavlja se da krpelji imaju mali značaj u prenošenju virusa na domaće svinje u Africi, već da je za njih primarni izvor infekcije divlja svinja. Replikacija virusa kod odraslih kategorija *Phacochoerus africanus* i *Potamochoerus larvatus* ne može se ustanoviti, za razliku od mlađih kategorija koje se inficiraju još dok su u brlozima i kod kojih se razvijaju viši titri virusa u krvi (Kleiboeker & Scoles, 2001).

Kompetentni *Ornithodoros spp.* vektori su pronađeni i van Afrike. Na tlu Evrope, *O. erraticus* i *O. verrucosus* se smatraju potencijalnim kompetentnim vektorima. *Ornithodoros erraticus* je rasprostranjen na prostoru Pirinejskog poluostrva. Kao i većina *Ornithodoros spp.* krpelja, karakteriše ga vrlo ograničeno stanište. Prvi opis *O. erraticus* kao kompetentnog vektora za virus AKS je dao Sanchez (1963), dok je kasnijim istraživanjima dokazana mogućnost seksualnog i transstadijalnog prenošenja virusa, s tim da transovarijalna transmisija nije dokazana (Boinas i sar. 2014). *Ornithodoros verrucosus* je takođe proučavan kao kompetentan vektor za AKS. Ovaj krpelj nastanjuje istočnu Evropu (Ukrajina, Kavkaz). Autori de Oliveira i sar. (2019) su u studiji iz 2019. godine konstatovali izostanak replikacije evropskih sojeva virusa AKS u krpeljima *O. erraticus* i *O. verrucosus* i smatraju da je njihov značaj za transmisiju evropskih sojeva virusa nizak. Dalja istraživanja sa drugim sojevima virusa su neophodna radi procene potpune kompetentnosti vektora. U severnoj Americi su takođe detektovani potencijalni vektori i to: *O. coriaceus*, *O. turicata* i *O. puertoricensis* (Golnar i sar. 2019).

Cirkulacija virusa u populaciji domaćih svinja bez prisustva kompetentnih vektora

Infekcija domaćih svinja nastaje direktnim kontaktom sa drugim inficiranim svinjama ili indirektnim putem preko kontaminirane hrane, mehaničkih vektora, kontaminirane opreme i ljudi. Većina sojeva virusa izaziva akutnu hemoragijsku groznicu i 100 % letalitet 8-12 dana nakon infekcije (Costard i sar. 2009). Kod domaćih svinja opisan slučaj infekcije srednjevirulentnim sojem genotipa II virusa AKS u Kini 2020. godine (Sun et al. 2021 a, b). Trideset dana nakon inicijalne infekcije, svinje mogu prenositi virus putem direktnog kontakta. Virus opstaje u tkivima inficiranih svinja mesecima, te neadekvatno zbrinuti leševi uginulih domaćih i divljih svinja mogu predstavljati dugotrajan izvor infekcije. Jedan od najznačajnijih izvora infekcije za domaće svinje predstavljaju i mesne prerađevine i svinjsko meso kada se nađu u pomijama. Hranjenje svinja pomijama je jedan od najznačajnijih izvora infekcije u većini zemalja Afrike, Azije i nekim delovima Evrope (Costard i sar. 2009).

Epizootska pojava AKS u populaciji domaćih svinja bez prisustva kompetentnih vektora i divljih svinja je opisana u državama zapadne Afrike. Na ovim prostorima, prva epizootija je trajala 1957-1980. godine u istom periodu kada se AKS prvi put pojavila i u Evropi, a druga 1996-2003 godine (Penrith i sar. 2019). Pretpostavlja se da je tada došlo do infekcije najvećeg broja svinja i da se uzročnik održavao u populaciji domaćih svinja, uz brojne antropogene aktivnosti koje su doprinosile širenju virusa (Penrith i sar. 2019).

Cirkulacija virusa između divljih i domaćih svinja

Virus može nezavisno da se održava u populacijama divljih i domaćih svinja. Međutim, dvosmerno prenošenje virusa između ove dve populacije predstavlja ključan faktor u širenju različitih sojeva (Pepin i sar. 2023). Jedan od značajnih faktora za unošenje virusa u populacije divljih svinja koje do tada nisu bile zaražene je nepropisno odlaganje leševa uginulih domaćih svinja. U situacijama gde su biosigurnosne mere loše i gde postoji mogućnost međusobnog kontakta, postoji rizik od prenošenja virusa sa divljih na domaće svinje. Osim direktnog kontakta, širenje virusa se može vršiti i posrednim putem, poput hranjenja domaćih svinja pomijama, hranjenja svinja kontaminiranom hranom kao što je detelina i zelena trava, zatim korišćenjem proizvoda dobijenih od odstreljenih divljih svinja ili preko kontakta sa lovcima. Značaj antropogenih faktora u prenošenju virusa između populacije domaćih i divljih svinja ne treba zanemariti (Guinat i sar. 2016). To obuhvata neodgovarajuće postupanje sa stajnjakom, nepropisno bacanje proizvoda poreklom od svinja u prirodu, neadekvatan transport leševa

uginulih ili eutanaziranih svinja, kao i nepravilno odlaganje leševa, uključujući i bacanje leševa u prirodu. Opisani su slučajevi infekcije srednje virulentnim i nisko-virulentnim sojevima koji dovode do hroničnih infekcija divljih svinja (Pershin i sar. 2019; Gallardo i sar. 2021)

Cirkulacija virusa kod divljih svinja

Održavanje virusa u populaciji evropskih divljih svinja (*Sus scrofa*) se uglavnom povezuje sa kontaminiranim staništem. Virus se na divlje svinje može prenositi i širiti direktnim kontaktom ili strvinarenjem na leševima uginulih divljih svinja. Drugi lešinari mogu raznositi delove uginulih jedinki i na taj način širiti zarazu (Probst i sar. 2017). Održavanju virusa doprinosi čovek prihranjivanjem divljih svinja kao i namernim ukrštanjem domaćih i divljih svinja u cilju dobijanja F1 generacije meleza čije meso predstavlja specijalitet u nekim krajevima. Visoka vlaga i niske temperature omogućavaju dugotrajno održavanje virusa u okolini. Za razliku od klasične kuge svinja (KKS), gde je održavanje virusa u populaciji divljih svinja povezano primarno sa njihovom gustinom, kod AKS to nije slučaj. Naime KKS je u populacijama sa velikom gustinom svinja samoograničavajućeg karaktera usled male infektivne doze, visoke virulentnosti, kratkog inkubacionog perioda i kratkog toka bolesti (Moennig 2015). Slične pretpostavke su postojale i u slučajevima pojave AKS, ali zbog visoke oralne infektivne doze, visoke otpornosti virusa kao i pojave srednje virulentnih sojeva do samoograničavanja nije došlo čak ni u populacijama koje se karakterišu niskom gustinom divljih svinja (Chenais i sar. 2018, 2019).

PATOGENEZA

AKS je prirodno vektorska bolest afričkih svinja kod kojih infekcija nastaje ubodom zaraženog krpelja. U odsustvu krpelja, infekcija najčešće nastaje oro-nazalnim putem što objašnjava visoku infektivnu dozu neophodnu za nastanak infekcije. Primarna replikacija virusa se odvija u tonzilama i regionalnim limfnim čvorovima odakle se virus širi putem limfnih i krvnih sudova do sekundarnih organa. Viremija traje 4-8 dana, a može da traje nedeljama i mesecima usled nedostatka efikasnih neutralizacionih antitela (Sánchez-Vizcaíno i sar. 2019).

Virus ima najveći afinitet prema ćelijama monocitno-makrofagnog sistema. Uprkos činjenici da se radi o DNK virusu, replikacija se odvija u citoplazmi inficirane ćelije, a ne u jedru. U inficiranim makrofagima mogu se uočiti intracitoplazmatske inkluzije (jukstanuklearne). Smrt inficirane ćelije nastaje usled nekroze ili apoptoze. Do kog vida ćelijske smrti će doći zavisi od virusnih gena. Virus AKS poseduje gene koji mogu vršiti aktivaciju ili inhibiciju gena za programiranu ćelijsku smrt. Usled replikacije, virus dovodi do ushodne regulacije ćelijskih gena odgovorih za produkciju citokina kao što su IL-1, TNF- α i IL-6 time indukuje oluju citokina i posledično masovnu apoptozu limfocita (Salguero 2020).

Virus se umnožava u ćelijama plućnih intravaskularnih makrofaga, dovodeći do njihove nekroze i sekrecije velikog broja citokina (IL-1, TNF- α) usled čega dolazi po povećane propustljivosti endotela i stvaranja edema (Salguero 2020).

KLINIČKI SIMPTOMI

Klinički znaci i patomorfološke promene

Klinički znaci kod AKS mogu varirati u zavisnosti od virulencije virusa, infektivne doze, ulaznih vrata i karakteristika domaćina. U skladu s tim, tok bolesti može biti perakutan do hroničan.

Inkubacija traje od četiri do devetnaest dana. U eksperimentalnim uslovima, u zavisnosti od doze i načina inokulacije virusa, inkubacija traje svega dva do pet dana (Sánchez-Vizcaíno i sar. 2019).

Perakutni tok bolesti

Perakutni tok bolesti AKS je karakterističan za infekcije nastale visoko-virulentnim sojevima. Klinički znaci nastaju naglo i obuhvataju visoku telesnu temperaturu (42 °C), anoreksiju i letargiju. Uginuća nastaju u roku od par dana. Letalitet dostiže 100 %. Usled brzog toka bolesti, patomorfološke promene često nisu evidentne.

Akutni tok bolesti

Akutni tok bolesti je najčešći i karakterističan je za infekcije uzrokovane srednje do visoko-virulentnim sojevima virusa AKS. Klinički znaci uključuju visoku telesnu temperaturu (40-42 °C), letargiju, anoreksiju, cijanotične promene oko ušne školjke, njuške, abdomena, udova, repa i perianalne regije. Promene po koži se karakterišu pojavom petehija i ekhimoza. Visoko-virulentni sojevi često izazivaju promene na respiratornom sistemu, sa pojavom pulmonalnog edema. Moguća je pojava nosnog iscetka, epistakse, melene, dijareje i povraćanja. Kod gravidnih krmača česti su pobačaji. Patomorfološke promene kod akutnog toga se karakterišu brojnim hemoragičnom infarktima sa splenomegalijom. Slezina je uvećana, tamne boje, mrvičaste konzistencije. Takođe, u velikom broju slučajeva su zabeležene hemoragične promene po limfnim čvorovima (multifokalni hemoragični limfadenitis). Limfni čvorovi su izrazito hemoragični sa slabo vidljivom strukturom. Promenama su najčešće zahvaćeni gastrohepatični, renalni, ileocekalni i mezenterični limfni čvorovi. Petehije se mogu zapaziti po kori bubrega, krvarenja po mukozni i serozni unutrašnjih organa, tankom crevu, epikardu srca i mokraćnoj bešici (Salguero 2020).

Hronični tok bolesti

Hroničan tok bolesti je veoma redak, javlja se kod infekcija niskovirulentnim sojevima. Hronični tok bolesti je opisan na Pirinejskom poluostrvu i Dominikanskoj Republici tokom šezdesetih godina prošlog veka. Klinički znaci se karakterišu multifokalnim nekrozama po koži, artritismom i hroničnim mršavljenjem, respiratornim znacima i pobačajima (Salguero, 2020). Srednje virulentni sojevi virusa genotipa II AKS koji su otkriveni u toku trenutne epizootije nisu doveli do ispoljavanja hroničnog toka bolesti (Salguero, 2020).

DIJAGNOSTIKA

Dijagnostika

Dijagnostika AKS se zasniva na pojavi kliničkih znakova i laboratorijskoj potvrdi dijagnoze.

U laboratoriji, infekcija virusom AKS se može potvrditi direktno, izolacijom virusa ili njegovih strukturnih delova, ili indirektno dokazivanjem humoralnog imunološkog odgovora.

Izolacija virusa

Za izolaciju virusa se mogu koristiti primarne kulture tkiva i kontinuirane ćelijske linije. Veliki problem predstavlja nemogućnost izolacije terenskih sojeva virusa AKS na kontinuiranim ćelijskim linijama. Inicijalna izolacija virusa je izvršena na primarnoj kulturi tkiva poreklom od leukocita svinja još 1960. godine, a dalji napredak i razlikovanje AKS od klasične kuge svinja je omogućeno otkrićem efekta hemadsorpcije (Malmquist i Hay 1960).

Budući da su monociti i makrofagi ciljne ćelije za replikaciju virusa ćelijske linije poreklom od ovih ćelija se koriste za izolaciju virusa. Za izolaciju se mogu koristiti monociti iz različitih organa sa različitim tehničkim modifikacijama u zavisnosti od mogućnosti dobijanja što čistije kulture. Osteljivost ovih ćelija takođe zavisi od maturacije i stepena diferencijacije.

Najčešće korišćene primarne kulture tkiva poreklom od svinja:

1. Monociti poreklom iz krvi svinja

Divlji sojevi virusa AKS uspešno se replikuju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi što se indirektno dokazuje testom hemadsorpcije (Meloni i sar. 2022). Sojevi virusa koji nemaju sposobnost hemadsorpcije se dokazuju indirektno, na primer imunofluorescentnim testovima. Rad sa primarnim ćelijskim kulturama pored brojnih prednosti, ima i nedostatke kao što su vreme trajanja ogleda i etička neprihvatljivost (de León i sar. 2013).

2. Alveolarni makrofagi svinja

Alternativni izvor makrofaga za izolaciju virusa AKS su alveolarni makrofagi dobijeni lavažom pluća svinja. Tehnika korišćena za dobijanje alveolarnih makrofaga je inicijalno opisana na kunićima, a kasnije modifikovana za svinje. Najveće prednosti ove ćelijske kulture su visoka prijemčivost za divlje sojeve virusa, zatim mogućnost proizvodnje velikih serija ćelija čime se obezbeđuju isti uslovi i ponovljivost eksperimenta (Meloni i sar. 2022). Glavni nedostaci su veliki tehnički zahtevi, ugrožavanje dobrobiti životinja i varijacije u fenotipu dobijenih makrofaga u zavisnosti od životinje od koje se dobijaju.

3. Monociti poreklom iz koštane srži svinja

Monociti poreklom iz koštane srži se, takođe, mogu koristiti za izolaciju virusa AKS. U zavisnosti od korišćene metodologije varira i njihova vijabilnost kao i uspešnost izolacije (Meloni i sar. 2022). Monociti poreklom iz koštane srži svinja su uspešno korišćeni za izolaciju soja virusa AKS pri čemu nakon 6 pasaža nije došlo do promene antigenskih karakteristika soja (Chen i sar. 2020). Opisani su i novi protokoli za proizvodnju ovih ćelijskih kultura kojim se dobijaju ćelije veće osetljivosti za divlje sojeve i koje proizvode više titra virusa (Puzankova i sar. 2023).

4. Renalni makrofagi poreklom od svinja

Virus AKS je moguće izolovati i na primarnim kulturama tkiva poreklom od bubrega svinja (Oh i sar. 2021). Iz primarnih kultura bubrega mogu se dalje dobiti ćelijske linije koje ispoljavaju karakteristike monocita pošto na svojoj površini ispoljavaju CD163, CD172a i Iba1 markere karakteristične za monocite (Meloni i sar. 2022) što ih čini prijemčivim za virus AKS (Oh i sar. 2021; Meloni i sar. 2022).

Najznačajnije kontinuirane ćelijske linije poreklom od majmuna koje se mogu koristiti za izolaciju AKS

Izvođenje klasičnih virusoloških metoda na primarnim kulturama tkiva nije samo nepraktična, već i etički neprihvatljiva. Međutim, ovakvi izazovi prevaziđeni su prilagođavanjem divljih sojeva ćelijskim linijama poreklom od majmunskih bubrega, poput VERO, MS i COS. Ipak, tokom adaptacije sojeva dešavaju se značajne promene na nivou genoma usled čega ove ćelijske linije imaju ograničenu upotrebu.

1. VERO ćelijska linija

VERO ćelijska linija je dobijena od bubrega afričkog zelenog majmuna. Prvu izolaciju virusa AKS na VERO ćelijama su izvršili Hes i sar. 1971. godine. Za razliku od primarnih kultura tkiva, na VERO ćelijskoj liniji može da se radi neutralizacioni test redukcije plaka (Meloni i sar. 2022). Direktna izolacija divljih sojeva virusa na VERO ćelijama nije moguća, već je neophodna prethodna izolacija na primarnim kulturama tkiva. Umnožavanjem sojeva na VERO ćelijama dolazi do akumulacije tačkastih mutacija i delecija u genomu virusa što dovodi do gubitka imunogenosti i virulentnosti. Jedan od takvih primera je i BA71V soj koji je razmatran kao kandidat za vakcinu (Meloni i sar. 2022).

2. COS ćelijske linije

COS ćelijske linije su dobijene od bubrega zelenog majmuna i mogu se koristiti za *in vitro* replikaciju virusa AKS (Carrascosa i sar. 2011). Za izolaciju AKS se mogu koristiti COS-1 i COS-7 ćelijske linije. COS-1 ćelijske linije su uspešno korišćene za izolaciju sojeva genotipa I i genotipa II. Slično kao i kod Vero ćelijskih linija, određivanje titra virusa se može vršiti na osnovu testa redukcije plaka (Meloni i sar. 2022). Sojevi virusa AKS umnoženi na COS-1 ćelijskim linijama pokazuju veću gensku stabilnost. BA71V Δ CD2 i Δ EP153R sojevi, deletirani mutanti genotipa II koji ne mogu da se umnožavaju u alveolarnim makrofagima svinja mogu umnožavati na COS ćelijskim linijama. Od skora, COS-7 ćelijske linije su uspešno korišćene za umnožavanja vakcinalnih sojeva (NH/68) virusa AKS (Gallardo i sar. 2018).

3. MA-104 ćelijske linije

MA-104 je kontinuirana ćelijska linija poreklom od epitelnih ćelija bubrega afričkog zelenog majmuna. Na ovoj ćelijskoj liniji su uspešno izolovani sojevi genotipa II kao i laboratorijski adaptirani sojevi. Ispitivanje hemadsorpcionih sposobnosti virusa se može vršiti na ovoj ćelijskoj liniji (Meloni i sar., 2022).

Najznačajnije kontinuirane ćelijske linije poreklom od svinja koje se mogu koristiti za izolaciju virusa AKS:

4. WSL ćelijske linije

WSL ćelije su poreklom od pluća fetusa divljih svinja. Karakteriše ih veliki broj ekspimiranih SLA II i SW3 receptora, a manji broj CD163 i CD169 što ukazuje da se radi o prekursorima makrofaga (Sánchez i sar. 2017). Na ovoj ćelijskoj liniji je moguće umnožavati modifikovane i većinu divljih sojeva virusa sa vrlo sličnom uspešnošću kao i kod plućnih alveolarnih makrofaga (Sánchez i sar. 2017; Keßler i sar. 2018).

5. IPAM ćelijske linije

Besmrtni plućni alveolarni makrofagi poreklom od svinja su nova ćelijska linija proizvedena od svinjskih alveolarnih makrofaga. Besmrtni klonovi su dobijeni transfekcijom primarnih PAM ćelija plazmidom pSV3neo koji nosi gene za sintezu velikih SV40 T antigena. Najčešće korišćeni klon je 3D4. U IPAM ćelijskoj liniji replikuju se ASFV-Lisabon 61, Lillie SI/85, Lisabon57, Malawi82, ali ne i sojevi Armenia/07 i atenuirani soj NH/P68 (Sánchez i sar. 2017).

Detekcija virusnih antigena

Za utvrđivanje prisustva virusnih antigena mogu se koristiti AgELISA testovi, s tim da je osetljivost ovih ELISA testova niža od osetljivosti PCR testova ili izolacije na ćelijskim linijama.

1. Test lateralnog protoka (Lateral flow device, LFD, eng.), brzi testovi.

Testovi lateralnog protoka predstavljaju brze dijagnostičke testove koji se koriste za utvrđivanje prisustva antigena i/ili antitela. Test se bazira na obojenoj reakciji antigen-antitelo koja se odvija na celuloznoj traci na koju su na određenim mestima naneti virusni antigeni (detekcija antitela) ili antitela (detekcija antigena). Značajna prednost ovih testova je jednostavnost njihovog korišćenja kao i mogućnost upotrebe u terenskim uslovima što ne isključuje potrebu za laboratorijskom potvrdom rezultata. Razvijeni su novi LFD testovi koji kao detekcioni sistem koriste fluorescentne nanočestice obeležene europiumom kojima se istovremeno može detektovati i virusni antigen i specifična antitela. Ovakav tip testa omogućava potvrdu infekcije u slučajevima kada titar virusa u krvi počinje da opada (nakon 7 dana infekcije), jer raste titar antitela (Aira i sar. 2023).

2. Ag ELISA test

Ag ELISA test se može koristiti za detekciju antigena virusa AKS. Osetljivost testa je dosta niža od izolacije virusa na kulturi tkiva kao i molekularnih metoda detekcije te se usled toga rezultati ELISA testa moraju potvrditi navedenim metodama (WOAH Terrestrial Manual 2024).

Molekularne metode detekcije virusa AKS

1. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction-PCR) se koristi za utvrđivanje prisustva delova genoma specifičnih za virus AKS. Zasniva se na umnožavanju specifičnog dela genoma DNK polimerazom sa odgovarajućim komplementarnim oligonukleotidnim kratkim sekvencama (prajmeri). Umnoženi fragmenti se mogu vizuelizovati bojenjem interkalatnim bojama vidljivim pod UV svetlom nakon elektroforeze. Kada se reakcija amplifikacije prati eksponencijalnim porastom signala koji daje interkalatna boja vezana za dvostruki lanac DNK u realnom vremenu, metoda se naziva real time PCR.

U zavisnosti od dela genoma koji se amplifikuje, PCR može biti genotipski specifičan. Opisan je veliki broj različitih konvencionalnih i real-time protokola za detekciju virusa AKS kao i komercijalnih PCR kitova.

Svetska zdravstvena organizacija za zdravlje životinja preporučuje korišćenje tri protokola, jedan za konvencionalni PCR i dva za real-time PCR. Protokol za konvencionalni PCR po Agüero

i sar. (2003) se može koristiti kao multiplex metoda za istovremenu detekciju virusa AKS i KKS (WOAH Terrestrial Manual 2024).

Protokoli opisani za real-time PCR obuhvataju protokol po King i sar. (2003) koji omogućava detekciju C-terminalnog kraja B646L gena kao i protokol po Fernández-Pinero i sar. (2013) koji je pokazao visoku dijagnostičku osetljivost i može se koristiti i za detekciju genoma virusa u ranim i kasnim fazama infekcije. Takođe u upotrebi se nalaze i komercijalni kitovi različitih proizvođača za brzu detekciju nukleinske kiseline virusa AKS.

2. Sekvenciranje genoma

a. Sanger sekvenciranje

Sekvenciranje po Sangeru, poznato i kao metoda „terminacije lanca“, predstavlja tehniku sekvenciranja DNK razvijenu od strane Frederika Sangera 1977. godine (Sanger i Coulson 1975). Ova metoda se koristi za precizno utvrđivanje redosleda nukleotida kratkih DNK segmenata.

b. Sekvenciranje celog genoma

Sekvenciranje celog genoma virusa AKS je prvi put uspešno izvedeno 1995. godine kada je sekvenciran soj BA71V. Danas se za sekvenciranje celog genoma koriste napredne tehnike:

- 1) „Shotgun sequencing“ – Druga generacija platformi za sekvenciranje
Shotgun sequencing je metoda koja se zasniva na razbijanju DNK u male fragmente (50-500 bp) koji se potom sekvenciraju. Dobijene sekvence se zatim softverski slažu u odnosu na zadate sekvence tako da se dobije jedna sekvenca celog genoma. Opisana metoda je vrlo precizna i pouzdana. Osnovni nedostatak ove metode je neselektivnost tj. vrši se sekvenciranje svih zatečenih DNK molekula, uključujući i ćelijsku DNK. Radi prevazilaženja ovog nedostataka vrši se „obogaćenje mete“ (*target enrichment*, eng.) i uklanjanje genoma domaćina (*host depletion*, eng.).
- 2) Treća generacija sekvencera – očitavanje dugih i ultra dugih sekvenci
Treća generacija sekvenciranja se zasniva na dobijanju ekstra dugih sekvenci (*long reads*, eng.). Ovaj tip sekvenciranja smanjuje vreme neophodno za rekonstrukciju genoma s tim da preciznost (*accuracy*, eng.) i pokrivenost (*coverage*, eng.) genoma opadaju. Autori Forth i sar. (2019) su koristili uređaj ION (Oxford Nanopore, UK) u cilju dobijanja rekonstruisanog genoma, a nedostatak u preciznosti su nadomestili hibridnim sekvenciranjem na platformama druge generacije (Illumina, SAD). ION nanopore tehnologija se zasniva na provlačenju niti DNK kroz nanopore, pri čemu sa svakim prolaskom nukleotida dolazi do promene u naelektrisanju koje uređaj beleži kao jednu azotnu bazu. Drugi sistemi kao što je PacBio (The Pacific Biosciences, eng.) su takođe korišćeni za sekvenciranje celih genoma (Granberg i sar. 2016).

Detekcija antitela

1. ELISA testovi

Detekcija antitela se može vršiti primenom komercijalnih indirektnih ili kompetitivnih ELISA kitova. Većina komercijalnih ELISA testova zasnovana je na detekciji specifičnih

antitela protiv p72 proteina kao najimunodominantnijeg. U dizajnu ELISA postoji mogućnost upotrebe i drugih virusnih proteina, na primer pB602L (Yang i sar. 2022). ELISA su praktični i jednostavni za korišćenje, ali specifičnost i osetljivost variraju. Upoređujući komercijalne ELISA testove, utvrđena je generalno visoka osetljivost, ali specifičnost je varirala od 80 % do 100 % u zavisnosti od proizvođača kita (Gallardo i sar. 2015).

2. Virus neutralizacioni - imunoperoksidaza test (VNT-IPT)

Imunoperoksidaza testom (IPT) se vrši vizualizacija/bojenje imunih kompleksa nastalih u postupku neutralizacije virusa specifičnim antitelima. Test se izvodi na VERO ili MS ćelijskim linijama, ili primarnim kulturama tkiva. Nakon inokulacije određenim titrom adaptiranog soja virusa AKS, ćelijske linije se fiksiraju na 96-bunarskim pločama i koriste kao antigeni u reakciji. Ukoliko su u ispitujućem serumu prisutna specifična antitela, dolazi do reakcije sa virusnim antigenima i nastanka imunih kompleksa. Za vizuelizaciju se koriste anti svinjska IgG antitela obeležena protein A - peroksidazom (enzim) i vodonik-peroksid. Kao rezultat reakcije dolazi do crvenog prebojavanja ćelija za čije Ag su se vezala specifična antitela. VNT-IPT testovi su osetljiviji od ELISA testova ili imunoblot testova (IBT) (Gallardo i sar. 2022).

3. Imunoblot test

Imunoblot predstavlja brzu i visokoosetljivu metodu za detekciju antitela, a zasniva se na inherentnoj specifičnosti Ag-At reakcije. Ova procedura podrazumeva solubilizaciju virusnih proteina, njihovo elektroforetsko razdvajanje na osnovu molekulske mase, kao i transfer razdvojenih proteina na specijalne membrane, najčešće od nitroceluloze. Membrana se potom inkubira sa ispitujućim serumom. U slučaju prisustva specifičnih antitela protiv virusa AKS u serumu, nastali imunokompleksi se vizuelizuju dodavanjem proteina A konjugovanog peroksidazom i 4-hloro-1-naftolom kao supstratom. Serumi koji pokazuju specifičan obrazac reakcije sa proteinima određene molekulske mase kao i pozitivna kontrola se smatraju pozitivnim na prisustvo antitela. IBT karakteriše nešto niža osetljivost od ELISA testova, a viša specifičnost usled čega se koristi kao potvrdna analiza (Gallardo i sar. 2015).

Diferencijalna dijagnostika

Diferencijalna dijagnostika AKS predstavlja imperativ usled kliničkih simptoma koji se često mogu pomešati sa drugim bolestima svinja. Kod pojave kliničkih znakova dole pobrojanih bolesti treba uzeti u obzir i obavezno isključiti AKS:

1. Klasična kuga svinja,
2. Crveni vetar (*Erysipelotrix rhusiopathiae*),
3. Salmoneloza,
4. Pastereloza,
5. Aktinobacilusna pleropneumonija,
6. Edemska bolest svinja,
7. Cirkovirus svinja,
8. Reproductivni i respiratorni sindrom svinja,
9. Parvoviroza svinja.

PREVENCIJA I KONTROLA

Vakcinacija

Vakcinacija protiv AKS bi mogla predstavljati najoptimalniju strategiju za prevenciju i kontrolu AKS, ali do danas nije razvijena ni jedna vakcina zadovoljavajućih karakteristika.

Do sada su opisani pokušaji razvoja inaktivisanih, subjediničnih i atenuiranih vakcina.

1. *Inaktivisane vakcine protiv AKS*

Prve inaktivisane vakcine protiv AKS su nastale tokom šezdesetih godina 20. veka. Inaktivacija virusa je vršena termičkim i hemijskim postupcima, uključujući upotrebu toluena, formaldehida i kristal violeta. Osnovni nedostatak inaktivisanih vakcina je bila loša imunogenost (Blome i sar. 2014).

2. *Žive atenuirane vakcine protiv AKS*

Atenuirane vakcine protiv AKS koncipirane su *in vitro*, korišćenjem prirodnih ili veštačkih metoda slabljenja virusa. Osnovni nedostatak ovih vakcina je reverzna virulencija.

a) *Prirodno atenuirani sojevi virusa AKS*

Prirodno atenuirani sojevi virusa AKS su izolovani iz mekih krpelja i hronično inficiranih svinja. Vakcine na bazi živih atenuiranih sojeva mogu pružiti određeni nivo zaštite od srodnih sojeva virusa kod svinja. Međutim, efikasnost varira zbog individualnih razlika, doze imunogena i varijabilnosti sojeva koji izazivaju infekciju. Svinje imunizovane vakcinama sa prirodno atenuiranim sojevima često pokazuju značajne neželjene reakcije, uključujući simptome poput povišene telesne temperature, spontanijih pobačaja i hroničnih infekcija (Zhang i sar. 2023a). Vrlo značajna je i mogućnost vraćanja virulencije i pojave novih vakcinalnih visoko-virulentnih sojeva. Prirodno atenuirani sojevi su do sada pronađeni u baltičkim zemljama. Uspešno je izolovan jedan srednje do nisko-virulentan soj koji ne pokazuje mogućnost hemadsorpcije iz Letonije (Lv17/WB/Rie1). Svinje inficirane Lv17/WB/Rie1 pokazuju atipične kliničke znakove ili dolazi do pojave supkliničke infekcije (Gallardo i sar. 2019). Živi prirodno atenuirani sojevi su dobri kandidati za vakcine koje bi se primenile u populacijama divljih svinja, ali opasnost od mogućeg ponovnog širenja soja i vraćanja virulencije kao i nedostatak studija o trajanju imuniteta ograničava njihovu primenu.

b) *Sojevi atenuirani pasažama na ćelijskim linijama*

Prilikom propagacije virusa na kontinuiranim ćelijskim linijama (VERO) dolazi do atenuacije virusa usled značajnih genskih delecija (Zhang i sar. 2023a). U istraživanjima sprovedenim šezdesetih godina prošlog veka, utvrđeno je da je vakcina sa oslabljenim sojem dobijenim pasažama na ćelijama koštane srži svinja dala dobre rezultate. Sa druge strane, vakcine dobijene od sojeva pasiranih 110 puta na VERO ćelijskoj liniji ne obezbeđuju nikakvu zaštitu protiv divljih sojeva virusa (Zhang i sar. 2023a).

c) *Atenuirane vakcine sa ciljnim genskim delecijama*

Jedan od obećavajućih pristupa u borbi protiv AKS predstavlja kreiranje atenuiranih vakcina sa delecijom gena koji su fundamentalno povezani sa virulentnošću, imunosupresivnim svojstvima virusa, ili strukturnim genima koji uzrokuju anomalije u

formiranju viriona. Geni kao što su CDV2, E184L, I177L, DP148R, timidin kinaza (TK) i mnogi drugi imaju ključnu ulogu u virulenciji virusa (Zhang i sar. 2023a). Prva komercijalna atenuirana vakcina sa delecijom gena, ASFV-G- Δ I177L, razvijena je u Vijetnamu (Zhang et al. 2023a). Početna istraživanja u kojima je vakcina aplikovana na svinjama evropskog i vijetnamskog porekla u minimalnoj zaštitnoj dozi od 10^2 HAD₅₀ ASFV-G- Δ I177L, pokazala su da vakcina obezbeđuje zaštitu prilikom veštačke infekcije genotipom II virusa AKS (Tran et al. 2022b, a). Informacije o efikasnosti vakcine u uslovima komercijalnih farmi nisu bile dostupne u trenutku pisanja ove disertacije.

d) Subjedinične vakcine

Subjedinične vakcine su proteinske vakcine dobijene specifičnom ekspresijom pojedinih gena virusa u Baculovirusnom sistemu. Na ovaj način je omogućena stimulacija humoralnog i celularnog imunog odgovora domaćina, bez opasnosti od pojave novih mutanata ili reverzije virulencije virusa. Do sada su razvijene subjedinične vakcine na osnovu p72, p54, CDV2, p30, p12, i p22, ali većina korišćenih antigena ne dovodi do stvaranja zaštitnog imuniteta (Niedzwiecki 2011).

e) DNK vakcine

DNK vakcine predstavljaju najčešće plazmid koji sadrži određene virusne gene koji se transkribuju po ulasku u ćelije domaćina. Imunizacija svinja ovim tipom vakcina dovodi do jakog ćelijskog imunološkog odgovora. Rekombinantni plazmidi (pCMV-PQ i pCMV-APCH1PQ, p54/p30) koji su do sada testirani nisu dali zadovoljavajuće rezultate usled izostanka stvaranja neutralizacionih antitela (H. Zhang i sar., 2023).

f) Vektorske vakcine

Vektorske vakcine podrazumevaju upotrebu apatogenih virusa kao nosača ključnih gena virusa AKS. Za proizvodnju vektorskih vakcina protiv AKS su korišćeni virusni vektori u koje su umetnuti p30, pp62, p54, p72 i CD2v kao imajući u vidu njihovu visoku imunogenost i pokretanje proizvodnje neutralizacionih antitela. Takođe, ovaj tip vakcina je u skladu sa DIVA (Razlikovanje vakcinisanih od inficiranih životinja - Differentiating Infected from Vaccinated Animals, eng.) strategijom. Inicijalna ispitivanja pokazuju relativno dobre rezultate posebno kada se vektorske vakcine kombinuju sa atenuiranim vakcinama, pri čemu su vektorske vakcine korišćene za primarnu imunizaciju, a atenuirane za pojačavanje imunološkog odgovora (Murgia i sar. 2019). Nove tehnologije kao što je reverzna genetika, CRISPR/Cas9 izmena gena nude nove mogućnosti u proizvodnji rekombiniranih vakcina (H. Zhang i sar. 2023).

CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Izolacija i genska karakterizacija virusa AKS u Srbiji u periodu 2019–2023. godine ispitivanjem reprezentativnog broja sojeva virusa u odnosu na vrstu domaćina i prostorno-vremensku distribuciju klasičnim virusološkim i molekularnim metodama.
2. Genotipizacija i utvrđivanje podgenotipova virusa koji su u navedenom vremenskom periodu prisutni u Srbiji analizom četiri genska markera.

3. Posredno utvrđivanje virulencije srpskih sojeva izolacijom virusa na primarnim ćelijskim kulturama.
4. Utvrđivanje promena u genskom materijalu virusa sekvenciranjem celog genoma.

Rezultati ovih ispitivanja treba da doprinesu rasvetljavanju i boljem razumevanju puteva unosa virusa u zemlju, lokalnog širenja i održavanja.

Zadaci istraživanja ove doktorske disertacije su:

Zadatak 1. Trijažno testiranje pozitivnih uzoraka iz banke uzoraka Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije real-time PCR metodom; odabir najmanje 90 pogodnih uzoraka ($Ct < 25$) za dalja molekularna ispitivanja u odnosu na vrstu i prostorno-vremensku distribuciju (5 uzoraka po okrugu u kom je prijavljena AKS, po godini od 2019-2023). Selekcija uzoraka se vrši u Microsoft Excel programu (Microsoft Corporation, Redmond, Wašington, SAD).

Zadatak 2. Ekstrakcija virusne DNK iz odabranih uzoraka i amplifikacija četiri genska markera odabranih uzoraka korišćenjem prajmera preporučenih od strane Referentne laboratorije EU za AKS primenom metode klasičnog PCR; izdvajanje PCR proizvoda specifične dužine, prečišćavanje i Sanger sekvenciranje (LGC Genomics GmbH, Berlin, Nemačka).

Zadatak 3. Analiza nukleotidnih sekvenci primenom softvera GeneiousPrime (Geneious Prime, Dotmaticus, Boston, Masačusets, SAD) i filogenetska analiza uzoraka u softveru Molecular Evolutionary Genetic Analysis - MEGA X (Pensilvanija, SAD); deponovanje obrađenih sekvenci u banku gena Nacionalnog centara za biotehnoške informacije (NCBI GenBank, Maryland, SAD).

Zadatak 4. Odabir i priprema najmanje 20 pozitivnih uzoraka pogodnih za izolaciju virusa na primarnim ćelijskim linijama poreklom od alveolarnih makrofaga svinja i leukocita svinja. Odabir uzoraka biće izvršen nakon filogenetske analize i utvrđivanja svih varijanti virusa AKS koji cirkulišu u Srbiji.

Zadatak 5. Priprema primarnih ćelijskih kultura poreklom od alveolarnih makrofaga svinja i leukocita svinja; inokulacija primarnih ćelijskih kultura pripremljenim pozitivnim materijalima; svakodnevno praćenje pojave citopatogenog efekta (CPE) i hemadsorpcije.

Zadatak 6. Sekvenciranje celog genoma najmanje 5 uzoraka odabranih na osnovu koncentracije i čistoće nukleinske kiseline; sekvenciranje metodom „shotgun“ na Illumina platformi (Milton, Cambridge, UK).

Zadatak 7. Analiza celih sekvenci virusa AKS primenom kompjuterskih programa GeneiousPrime (Geneious Prime, Dotmaticus, Boston, MA, SAD) i deponovanje u NCBI.

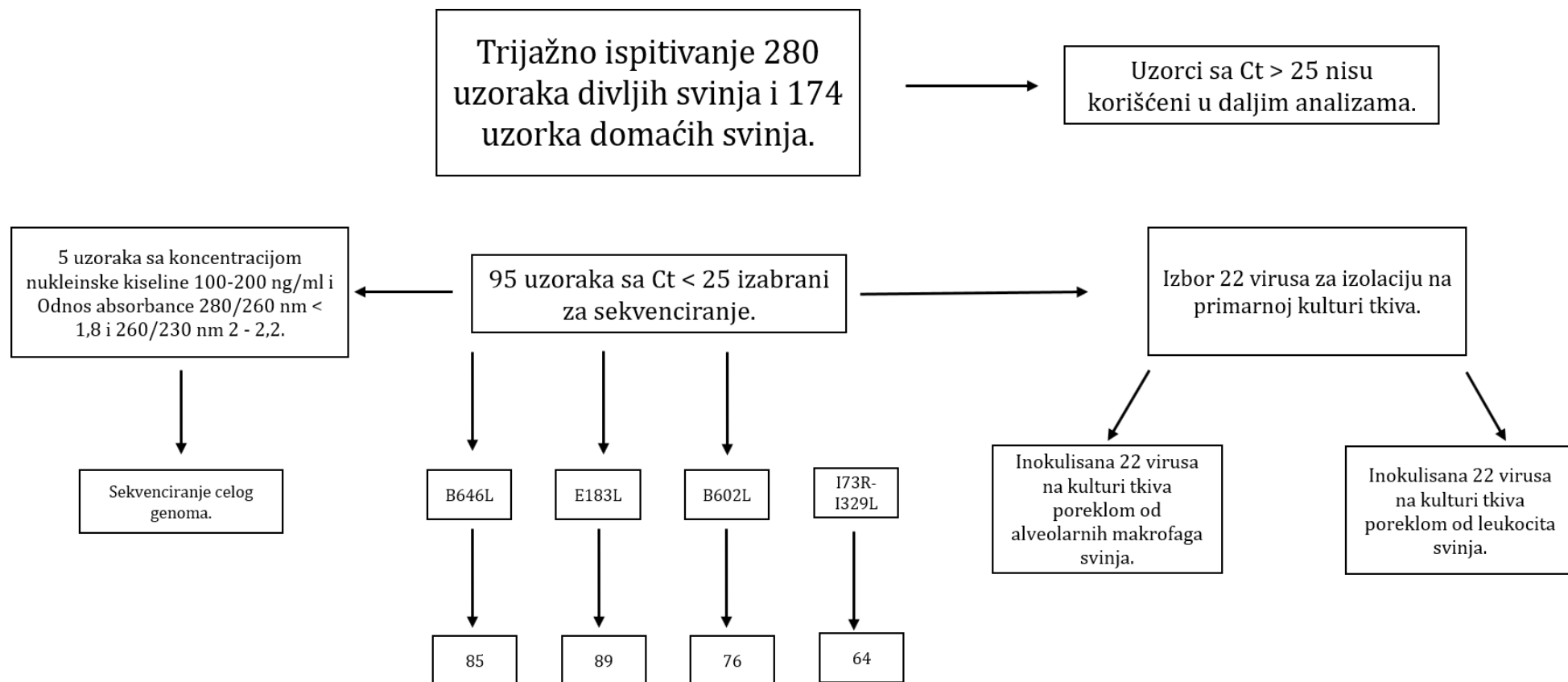
MATERIJAL I METODE

MATERIJAL

Uzorci za ispitivanje:

Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su uzorci pozitivni na prisustvo virusa AKS iz banke uzoraka Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije koji je Nacionalna referentna laboratorija za ovu bolest u Srbiji. Uzorci su uzeti od odstreljenih divjih svinja, uginulih divljih i domaćih svinja,

kao i obolelih domaćih svinja u okviru pasivnog i aktivnog nadzora na prisustvo virusa AKS. Izabrani uzorci obuhvataju 280 uzoraka poreklom od divljih svinja i 174 uzorka od domaćih svinja, iz četrnaest okruga Srbije (Srednjobanatski, Južnobanatski, Grad Beograd, Podunavski, Braničevski, Borski, Pomoravski, Rasinski, Zaječarski, Nišavski, Pirotski, Jablanički, Toplički, Pčinjski), u periodu od juna 2019. do marta 2023. godine.



Slika 2. Dijagram rada

Vrsta i način pripreme uzoraka:

Reprezentativnost uzoraka je obezbeđena ispitivanjem uzoraka iz svakog okruga na teritoriji u kojoj je zabeleženo prisustvo virusa AKS, od divljih i domaćih svinja, i svaku kalendarsku godinu u periodu 2019-2023. Uzorci su obuhvatali 94 uzorka organa (slezina i bubreg), 330 uzoraka krvi natopljene na pamučni bris (bris krvi) i 30 uzoraka koštane srži od uginulih divljih.

Uzorci su u zavisnosti od tipa pripremljeni za dalja ispitivanja na sledeći način. Organi (slezina, bubreg) su homogenizovani tučkom i tarionikom i pripremljeni kao 10 % suspenzija u minimalnoj esencijalnoj podlozi (MEM) sa dodatkom antibiotika (gentamicin 120 mg/l). Suspenzija organa je centrifugirana na 1500 g tokom 10 minuta, zatim je supernatant odliven i zamrznut na temperaturi od -80 °C do daljih ispitivanja.

Brisevi krvi su bili pripremljeni potapanjem u 1 ml MEM-a, zatim homogenizovani u aparatu TissueLyser LT (QIAGEN, Venlou, Holandija) i centrifugirani na 1500 g tokom 10 minuta. Supernatant je odliven i zamrznut na temperaturi od -80 °C do daljih ispitivanja.

Uzorci koštane srži su uzeti pamučnim brisevima natopljenim PBS-om iz epifiza dugih kostiju (femur) i zatim potopljeni u 900 µl PBS zatim homogenizovani u aparatu TissueLyser LT (QIAGEN, Venlou, Holandija) i centrifugirani na 1500 g tokom 10 minuta. Supernatant je odliven i zamrznut na temperaturi od -80 °C do daljih ispitivanja.

EKSTRAKCIJA DNK:

Automatska ekstrakcija DNK iz pripremljenih supernatanata organa i briseva je izvedena upotrebom komercijalnog kita (IndiSpin Pathogen Kit, Indical, Nemačka) i korišćenjem QIAcube Connect automatskog ekstraktora (QIAGEN, Venlou, Holandija). Volumen suspenzije za ekstrakciju je bio 200 µl, a volumen elutovane DNK virusa 100 µl.

Spisak opreme korišćene za ekstrakciju:

1. Biohazard kabinet (B-MaxPro, Berner flow Safe, Elmšorn, Nemačka),
2. Univerzalna centrifuga za 24 uzorka (5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka),
3. Homogenizator (TissueLyser LT, QIAGEN, Venlou, Holandija),
4. Uređaj za ekstrakciju (QIAcube Connect automatskog ekstraktora, QIAGEN, Venlou, Holandija).

Postupak ekstrakcije virusne DNK je izvršen po protokolu opisanom od strane proizvođača kita.

REAL TIME PCR

Trijažno testiranje uzoraka je izvedeno real time PCR testom po protokolu opisanom od strane King i sar. (2003) upotrebom komercijalnog kita.

Spisak opreme korišćene za real time PCR:

1. Laminarna komora (VBH48C2, Thermo Scientific, SAD),
2. MicroAmp® Optical 8-Cap Strips (Applied Biosystems - Thermo Scientific, SAD),
3. MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, 0.2 mL (Applied Biosystems - Thermo Scientific, SAD),
4. Centrifuga (FVL-2400N, Combi-Spin, Mičigen, SAD),
5. Real time PCR aparat (QIAquant 96 5 plex, Qiagen, Venlou, Holandija).

Spisak reagenasa korišćenih za real time PCR (Tabela 3, 4 i 5.):

1. Komercijalni qPCR kit (Luna® Universal Probe qPCR Master Mix, New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD),
2. PCR čista voda (Thermo Scientific, SAD),
3. Ekstrahovana nukleinska kiselina.

Tabela 3. Reakciona smeša korišćena u real time PCR-u.

Reagensi	Zapremina (12,5 µl)
Voda	2,75
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	6
F prajmer (10 µM)	0,50
R prajmer (10 µM)	0,50
Proba (10 µM)	0,25
Nukleinska kiselina	2,5

Tabela 4. Spisak prajmera i proba koji su korišćeni u real time PCR reakciji.

Sekvenca prajmera i probe	Referenca
AKS-F [5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3'] AKS-R [5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3']	King i sar. (2003)
AKS-P [5'-FAM CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG TAMRA - 3']	

Tabela 5. Temperaturni profil korišćen u real time PCR.

Koraci	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Denaturacija DNK virusa	95 °C	1 minut	x 1
Vezivanje prajmera	95 °C	15 sekundi	x50
Sintetisanje lanca DNK	60 °C	30 sekundi	

Uzorci sa Ct (Cycle treshold, eng.) vrednostima ispod 35 su smatrani pozitivnim. Uzorci sa Ct vrednostima 35-40 su smatrani sumnjivim i ponovljeni, a uzorci sa Ct vrednostima preko 40 su smatrani negativnim. Za dalje analize izabrani su uzorci čije su Ct vrednosti bile ispod 25.

U svaku analizu su uključene interne pozitivne i negativne kontrole ekstrakcije i amplifikacije.

KONVENCIONALNI PCR

Konvencionalni PCR je izveden za četiri genska markera: B646L, E183L, B602L i intergenski region između I73R i I329L gena. Za amplifikaciju ovih genskih markera korišćeni su ranije objavljeni prajmeri i temperaturni profil (Gallardo i sar. 2009, 2014) (Tabela 7-9.).

Spisak opreme korišćene za umnožavanje četiri genska markera:

1. Laminarna komora (VBH48C2, Thermo Scientific, SAD),
2. Centrifuga (FVL-2400N, Combi-Spin, Mičigen, SAD),
3. Tube zapremine 0,2 ml (Sarstedt, Nemačka),
4. PCR aparat (Eppendorf Mastercycler, Nemačka).

Spisak reagenasa korišćenih za reakciju klasičnog PCR (Tabela 6):

1. Komercijalni kit (QIAGEN HotStarTaq Master Mix, Les Ulis, Francuska),
2. PCR čista voda (Thermo Scientific, SAD),
3. Ekstrahovana nukleinska kiselina virusa.

Tabela 6. Reakciona smeša korišćena u PCR reakciji.

Reagensi	Zapremina (20 µl)
Voda	9,1
QIAGEN HotStarTaq Master Mix	7,5
F prajmer (10 µM)	0,7
R prajmer (10 µM)	0,7
Nukleinska kiselina	2

Tabela 7. Spisak prajmera koji su korišćeni u PCR-u.

Sekvenca prajmera	Dužina PCR proizvoda	Gen	Referenca
P72- U [5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3'] P72-D [5'-GTACTGTAACGCAGCACAG-3']	478 bp	B646L	Boshoff i sar., 2007.
ECO1A [5'-CCATTTATCCCCGCTTTGG-3'] ECO1B [5'-TCGTCATCCTGAGACAGCAG-3']	356 bp	IGR I73- I329L	Gallardo i sar., 2014.
PPA89 [5'-TGTAATTTTCATTGCGCCACAAC-3'] PPA722 [5'-CGAAGTGCATGTAATAACGTC-3']	558 bp	E183L	Gallardo i sar., 2009.
CVR1 [5'-ACTTTGAAACAGGAAACAATGATG-3'] CVR2 [5'-ATATTTTGTAATATGTGGGCTGCTG-3']	350-400 bp	B602L	Gallardo i sar., 2011.

Tabela 8. Temperaturni profil korišćen u PCR reakciji za umnožavanje B646L, E183L i B602L genskih delova.

Koraci	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Aktivacija Taq polimeraze	95 °C	15 minuta	x 1
Denaturacija DNK virusa	95 °C	30 minut	
Vezivanje prajmera	50 °C	30 sekundi	x 40
Sintetisanje lanca DNK	72 °C	1 minut	
Finalno izduživanje lanca DNK	72 °C	10 minuta	x 1

Tabela 9. Temperaturni profil korišćen u PCR reakciji za umnožavanje intergenskog regiona između I73L i I329L gena.

Koraci	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
---------------	--------------------	--------------	---------------------

Aktivacija Taq polimeraze	95 °C	15 minuta	x 1
Denaturacija DNK virusa	95 °C	30 minut	
Vezivanje prajmera	60 °C	30 sekundi	x 40
Sintetisanje lanca DNK	72 °C	1 minut	
Finalno izduzivanje lanca DNK	72 °C	10 minuta	x 1

Dobijeni PCR proizvodi su vizuelizovani elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu, na 60 V tokom 1 sata.

Spisak opreme korišćene za elektroforezu.

1. 1,5 % agarozni gel,
2. Transiluminator (Tcp-20-m, Vilber Lourmat, Koležejn, Francuska),
3. Kada za elektroforezu (Hofer, Nemačka),
4. Sistem za elektroforezu (EPS301, Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Priprema 1,5 % agaroznog gela:

Neophodni reagensi:

1. Analitička vaga,
2. Mikrotalasna pećnica,
3. Erlenmajerov sud od 200 ml,
4. Menzura,
5. Staklene posude of 500 ml,
6. Destilovana voda,
7. Agar (Biosell, Nemačka),
8. Etidijum bromid (Serva, Nemačka),
9. 50x TAE pufer (50x ROTIPHORESE®TAE, Roth, Nemačka).

Priprema:

U 75 ml 1xTAE pufera dodato je 1,5 g agaroze i skuvano u mikrotalasnoj pećnici (Tabela 10). Gel je razliven u kadicu i „češalj“ za formiranje bunara postavljen. Gel je osušen tokom 45 minuta na sobnoj tempertauri i potom uronjen u 1xTBE.

Tabela 10. Spisak reagenasa za pravljenje 1,5 % agaroznog gela

Reagensi	Količina
Agarozna	1,5 g
1x TAE pufer sa etidijum bromidom razblažen sa destilovanom vodom 1:50	75 ml

Dužina PCR proizvoda je određena poređenjem sa DNK markerom koji u sebi sadrži produkte dužine od 100 do 1000 baznih parova. PCR proizvodi specifične dužine su prečišćeni korišćenjem GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača.

Spisak opreme korišćene za prečišćavanje PCR proizvoda.

1. Biohazard kabinet (B-MaxPro, Berner flow Safe, Elmšorn, Nemačka),
2. Univerzalna centrifuga za 24 uzorka (5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR proizvoda su određeni merenjem i izračunavanjem odnosa OD vrednosti izmerenih za talasne dužine 260 nm i 280 nm spektrofotometrijski (EPOH, Biotek, Milano, Italija). Optimalne vrednosti spektrofotometrijskih merenja iznose 1,8-2 za čistoću odnosno 20-50 ng/μl za koncentraciju PCR proizvoda. Svi PCR proizvodi koji su imali odgovarajuće vrednosti su pripremljeni i poslani u komercijalan servis za sekvenciranje (LGC Genomics GmbH, Berlin, Nemačka) korišćenjem Sanger metodologije.

SEKVENCIJANJE CELOG GENOMA

Za sekvenciranje celog genoma izabrano je pet uzoraka na osnovu koncentracije i čistoće ekstrahovanih nukleinskih kiselina. Koncentracija i čistoća nukleinskih kiselina je vršena spektrofotometrijskim merenjem na 230 nm, 260 nm i 290 nm na uređaju Nanodrop (ThermoFisher, SAD). Kao pogodni za sekvenciranje izabrani su uzorci sa koncentracijom nukleinskih kiselina između 100 i 200 ng/ml, sa odnosom apsorbancije 280/260 nm ispod 1,8 i odnosom apsorbancije 260/230 nm između 2 i 2,2. Uzorci su sekvencirani na Illumina (San Diego, Kalifornija, SAD), platformi u Servisu sa sekvenciranje Novogene (Milton, Cambridge, UK) „shotgun“ metodom.

ANALIZA NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

Dobijene sekvence su analizirane korišćenjem softvera GeneiousPrime (Geneious Prime, Dotmatrix, Boston, Massachusetts, SAD), a filogenetska analiza je vršena primenom softvera MEGA X. Uklanjanje sekvenci prajmera, analiza kvaliteta, kao i formiranje konsenzus sekvence je vršeno primenom GeneiousPrime softvera i posebnih dodataka u okviru samog programa. Obradene sekvence su deponovane u banku gena Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI GenBank, Maryland, SAD). Algoritmi koji su korišćeni za filogenetsku analizu su određeni korišćenem opcije „Best Fit Models“ MEGA X programa. Modeli sa najnižim vrednostima su korišćeni za analizu.

Parcijalne genske sekvence i celi genomi virusa su poređeni sa drugim sekvencama iz banke gena za svaki deo genoma ponaosob (tabele 11 - 14), kao i za cele genome virusa (tabela 15)

Tabela 11. Sekvence B646L gena iz NCBI GenBank korišćene za poređenje.

<i>Naziv soja</i>	<i>Vrsta</i>	<i>Zemlja</i>	<i>Godina</i>	<i>Pristupni broj NCBI</i>
Pol18_28298_0111	Divlja svinja	Poljska	2017	MT847621
Pol17_55892_C754	Divlja svinja	Poljska	2017	MT847620
ASFV_HU_2018	Divlja svinja	Mađarska	2018	MN715134
ASFV Moldavija 2017/1	Divlja svinja	Moldavija	2017	LR722599
Estonia 2014	Divlja svinja	Estonija	2014	LS478113
ASFV/LT14/1490	Divlja svinja	Litvanija	2014	MK628478
2802/AL/2022 Italija	Domaća svinja	Italija	2022	ON108571
ASFV Nemačka 2020/1	Domaća svinja	Nemačka	2020	LR899193
Belgium/Etalle/wb/2018	Divlja svinja	Belgija	2018	MK543947
ASFV/Kyiv/2016/131	Divlja svinja	Ukrajina	2016	MN194591
ASFV/Kaliningrad_18/WB-9763	Divlja svinja	Rusija	2018	OM966717
ASFV/Primorsky 19/WB-6723	Divlja svinja	Rusija	2019	MW306191
ASFV/Ulyanovsk 19/WB-5699	Divlja svinja	Rusija	2019	MW306192
ASFV/Amur 19/WB-6905	Divlja svinja	Rusija	2019	MW306190

ASFV Gruzija 2007/1	Domaća svinja	Gruzija	2007	FR682468
Kina/Jilin/2018/boar	Divlja svinja	Kina	2018	MK189457
Ukr12/Zapo	Domaća svinja	Ukrajina	2012	KJ620037
Kina/Guangxi/2019	Domaća svinja	Kina	2019	MK670729
Pol19_01529_C88/19	Domaća svinja	Poljska	2018	MT889536
Pol17_31177_081	Divlja svinja	Poljska	2019	MT847622
D/ASF/P1/Vijetnam/2019	Domaća svinja	Vijetnam	2019	MW451091.1
D/ASF/P15/Vijetnam/2020	Domaća svinja	Vijetnam	2020	MW451093.1
ASFV/Kaliningrad_18/WB-12516	Divlja svinja	Rusija	2018	OM966720
Krasnodar_2012	Domaća svinja	Rusija	2012	KJ195685.1
103483/2018	Divlja svinja	Češka	2018	MW889890.1
Lisbon/57	Divlja svinja	Portugalija	1957	AF301537.1
Korea/Pig/Hwacheon1/2020	Divlja svinja	Južna Koreja	2020	MZ682070.1
Khabarovsk/30.04.2021/	Domaća svinja	Rusija	2021	OP019317.1
Indo/2020/Pig/West_Java	Domaća svinja	Indonezija	2020	MT851941.1
Amur/19.08.19.	Domaća svinja	Rusija	2019	MT840356.1
Ukraine_2014_Lugansk	Divlja svinja	Ukraine	2014	KJ496127.1
MK200	Divlja svinja	Mozambik	/	KJ526369.1
MOZ/94/1	Divlja svinja	Mozambik	1994	AF270711.1
SPEC/260	/	Južna Afrika	/	DQ250121.1
SPEC/245	/	Južna Afrika	/	DQ250117.1
RSA/1/96	/	Južna Afrika	/	DQ250125.1
MOZ_10/2006	Meki krpelj	Mozambik	/	KY353989.1
RSA/1/99/W	/	Južna Afrika	/	AF449477.1
RSA/1/95	/	Južna Afrika	/	DQ250123.1
BOT/1/99	/	Botsvana	1999	AF504886.1
SPEC/125	/	Južna Afrika	/	DQ250112.1
NAM/1/95	/	Namibija	/	DQ250122.1
ZIM/92/1	/	Zimbabve	/	DQ250119.1
Ndjassi-77	/	DR Kongo	1977	KM236553.1
NYA/12	/	Zambija	/	AY351555.1
Malawi/1978_	/	Malawi	1978	AF270707.1
TAN/1/01	/	Tanzanija	/	AY494552.1
TAN/2003/2	/	Tanzanija	/	AY494551
MFUE6/1	/	Zambija	/	AY351561
KAB/62	/	Zambija	/	AY351522.1
SUM/1411	/	Zambija	/	AY351542.1
ETH/1	Domaća svinja	Etiopija	/	KT795354.1
UGA2003/1	/	Uganda	/	AY351564.1
Hinde/1	/	Kenija	/	AY351530.1

Tabela 12. Sekvence E183L gena iz NCBI GenBank korišćene za poređenje.

Naziv soja	Vrsta	Zemlja	Godina	Genotip	Podgenotip	Pristupni broj NCBI
Mkuzi_1979	Ornithodoros spp.	Južna Afrika	1979	I	d	AY261362
Pretoriuskop/96/4	Ornithodoros spp.	Južna Afrika	1996	XX	a	AY261363

Tengani_62_	Domaća svinja	Malavi	1962	V	a	AY261364
Warthog_Namibia	Bradavičasta svinja	Namibija	2003	III		AY261366
Portugal_1957	Domaća svinja	Portugalija	1957	I	b	FJ174420
Fr64	Domaća svinja	Francuska	1963	I	a	FJ174421
Moz64	Domaća svinja	Mozambik	1964	V	b	FJ174422
MwLil20/1	Ornithodoros	Malavi	1983	VIII		FJ174425
Ug64	Domaća svinja	Uganda	2008	X	a	FJ174430
ASFV_Georgia_2007	Domaća svinja	Gruzija	2007	II		FR682468
LISBON_60	Divlja svinja	Portugalija	1960	I	c	X84889
Krasnodar_2012	Domaća svinja	Rusija	2012	II	II	KJ380910
Rom4	Domaća svinja	Rumunija	2018	II	II	MK863061.1
ASFV_HU_2018	Divlja svinja	Mađarska	2018	II	II	MN715134
103483/2018	Divlja svinja	Češka	2018	II	II	MW889888.1
Pol14/Sz	Divlja svinja	Poljska	2014	II	II	KJ627195.1

Tabela 13. Sekvence B602L gena iz NCBI GenBank korišćene za poređenje.

<i>Naziv soja</i>	<i>Vrsta</i>	<i>Zemlja</i>	<i>Godina</i>	<i>Pristupni broj NCBI</i>
South_Korea/19S5464/wb/2019	Divlja svinja	Južna Koreja	2019	MT300325.1
Orel2015	Divlja svinja	Rusija	2015	KY372397
Krasnodar2016	Domaća svinja	Rusija	2016	KY372398
RO/SM/2017/CVR	Domaća svinja	Romanija	2017	MN809122
Pol17_31177_081	Divlja svinja	Poljska	2019	MW361944.1
D/ASF/P1/VietNam/2019	Domaća svinja	Vijetnam	2019	MW451102.1
D/ASF/P15/VietNam/2020	Domaća svinja	Vijetnam	2020	MW451105
Korea/YC1/2019	Divlja svinja	Južna Koreja	2019	ON075797
Korea/HC224/2020	Divlja svinja	Južna Koreja	2020	OP628183
Abk07	Domaća svinja	Gruzija	2007	JX857523.1
Est16/WB/Tartu17	Divlja svinja	Estonija	2016	MT647531.1
Est15/WB-Tartu39	Divlja svinja	Estonija	2020	MT647535.1
Est17/WB/HARJU6	Divlja svinja	Estonija	2017	MT647548.1
Khabarovsk 2021/2132	Domaća svinja	Rusija	2021	OK358673
Az08B	Domaća svinja	Azerbejdžan	2008	JX857530
Rostov09	Domaća svinja	Rusija	2009	JX857532
Tver0312/Torjo	Divlja svinja	Rusija	2011	KJ627200
Tver0712/Les	Divlja svinja	Rusija	2011	KJ627200
Est16/WB/Tartu19	Divlja svinja	Estonija	2016	MT647533
Est16/WB/Tartu18	Divlja svinja	Estonija	2016	MT647532.1
Est17/WB/Parnu11	Divlja svinja	Estonija	2011	MT647550
Est17/DP/Parnu1	Domaća svinja	Estonija	2017	MT647544
Est17/DP/Parnu2	Domaća svinja	Estonija	2017	MT647545
Est17/DP/Parnu3	Domaća svinja	Estonija	2017	MT647546
Est17/WB/Parnu12	Divlja svinja	Estonija	2011	MT647551
Est17/DP/Parnu4	Domaća svinja	Estonija	2017	MT647547
Est17/WB/Parnu13	Divlja svinja	Estonija	2017	MT647552
Est17/WB/LANE12	Divlja svinja	Estonija	2017	MT647549
Est17/WB/Parnu14	Divlja svinja	Estonija	2017	MT647553

Pol14/Sz	Divlja svinja	Poljska	2014	KJ627206
LT14/1482	Divlja svinja	Litvanija	2014	KJ627204
LT14/1490	Divlja svinja	Litvanija	2014	KJ627205
Bel13/Grodno	Domaća svinja	Belorusija	2013	KJ627203
Ukr12/Zapo	Domaća svinja	Ukrajina	2012	JX857535
Sudogda-Vladimir_16	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098019
Arkhangelsk_16	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098020
Gorokhovets-Vladimir_17	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098021
Orel_17-WB/337	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098022
Krasnodar_07/15	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098023
Crimea_Martins_01/16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098024
Sobinka-Vladimir_16-WB	Divlja svinja	Rusija	2016	ON098025
Anino-Moscow_13-WB	Divlja svinja	Rusija	2013	ON098026
Sobinka-Vladimir_15-WB	Divlja svinja	Rusija	2015	ON098027
Kashino-Tver_13-WB	Divlja svinja	Rusija	2013	ON098028
Karamzino-Tver_13-WB	Divlja svinja	Rusija	2013	ON098029
Shihobalovo-Vladimir_13-WB	Divlja svinja	Rusija	2013	ON098030
Boguchary-Voronezh_13-DP/2051	Domaća svinja	Rusija	2013	ON098031
Volgograd_13-DP/2078	Domaća svinja	Rusija	2013	ON098032
Volgograd_13-DP/2059	Domaća svinja	Rusija	2013	ON098033
Voronezh_Agro_14-DP	Domaća svinja	Rusija	/	ON098034
Grafskoe-Belgorod_14-WB	Divlja svinja	Rusija	2014	ON098035
Odintsovo_02/14-Moscow_14-WB	Divlja svinja	Rusija	2014	ON098036
Gribovo-Kaluga_14-WB	Divlja svinja	Rusija	2014	ON098037
Vasilenki-Kaluga_08/14-WB	Divlja svinja	Rusija	2014	ON098038
Antonovo-Pskov_14-DP	Domaća svinja	Rusija	2014	ON098039
Ryazan_15-WB	Divlja svinja	Rusija	2015	ON098040
Saratov_01/15	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098041
Guskhrustalny-Vladimir_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098042
Ryazan(Autumn)_15-WB	Divlja svinja	Rusija	2015	ON098043
Bolhovskiy-Orel_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098044
Kurtnikovo-Moscow_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098045
Sashino-Vladimir_15-WB	Divlja svinja	Rusija	2015	ON098046
Smolensk_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098047
Kursk_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098048
Sokolckie_Vol-Krasnodar_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098049
Orel_15-DP	Domaća svinja	Rusija	2015	ON098050
Krasnodar_07/17	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098051
South_Osetia_16/DP/2325	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098052
Ryazan_03/16	Divlja svinja	Rusija	2016	ON098053
Ryazan_07/16-WB	Divlja svinja	Rusija	2016	ON098054
Shatsky_-Ryazan_16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098055
Orel-Mtsensk_16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098056
Kropotkin-Krasnodar_16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098057
Crimea_16-WB	Divlja svinja	Rusija	2016	ON098058
Vrachovo-Moscow_16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098059
Penza_16-DP	Domaća svinja	Rusija	2016	ON098060
Kolchugino-Vladimir_17-DP/5662	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098061
Sobinka-Vladimir_17-DP/5660	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098062
Sobinka-Vladimir_17-DP/328	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098063

Omsk_17-DP/5665	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098064
Vyaznikovski-Vladimir_17-WB/330	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098065
Irkutsk_17-DP/447	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098066
South_Osetia_17-DP/2196	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098067
Crimea_17-WB/470	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098068
Krasnoyarsk_10/2017	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098069
Omsk_10/2017	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098070
Belgorod_10/17	Domaća svinja	Rusija	2017	ON098071
Belgorod_12/17	Divlja svinja	Rusija	2017	ON098072
Kaliningrad_12/17	Domaća svinja	Rusija	/	ON098073
Kina/GX/201938	/	Kina	2019	OM986235
Kina/GX/201933	/	Kina	2019	OM986230
Kina/GX/201912	/	Kina	2019	OM986209
Kina/GX/201904	/	Kina	2019	OM986201

Tabela 14. Sekvence IGR I73R i I329L gena iz NCBI GenBank korišćene za poređenje.

Naziv soja	Vrsta	Zemlja	Godina	Podgenotip	Pristupni broj NCBI
ASFV/Amur	Divlja svinja	Rusija	2019	I	MW306190
ASFV Georgia	Domaća svinja	Gruzija	2007	I	FR682468
China/Jilin/201	Divlja svinja	Kina	2018	I	MK189457
Ukr12/Zapo	Domaća svinja	Ukrajina	2012	II	KJ620037
Pol18_28298_O	Domaća svinja	Poljska	2017	II	MT847621
Pol17_55892_C	Domaća svinja	Poljska	2017	II	MT847620
ASFV_HU_2018	Divlja svinja	Mađarska	2018	II	MN715134
China/Guangxi/	Domaća svinja	Kina	2019	III	MK670729
Pol19_01529_C	Domaća svinja	Poljska	2019	III	MT889536
POL18/WBCAS	Divlja svinja	Poljska	2018	IV	OQ030919
Pol19/WB/CAS	Divlja svinja	Poljska	2019	IV	OQ030929

Tabela 15. Sekvence celih genoma korišćenih za poređenje sa izolatima iz ove studije

Naziv soja	Vrsta	Godina	Pristupni broj NCBI
ASFV Georgia 2007/1	Domaća svinja	2007	NC044959
2802/AL/2022 Italy	Domaća svinja	2022	ON108571
ASFV Moldova 2017/1	Domaća svinja	2017	LR722599
Pol17_31177_081	Divlja svinja	2017	MT847622
ASFV/Kaliningrad_18/WB-12516	Divlja svinja	/	OM966720
ASFV Germany 2020/1	Domaća svinja	2020	LR899193
Belgium/Etalle/wb/2018	Divlja svinja	2018	MK543947

PRIPREMA PRIMARNE KULTURE TKIVA OD ALVEOLARNIH MAKROFAGA

Alveolarni makrofagi svinja se mogu koristiti kao zamena za krvne monocite svinja jer dele mnoge zajedničke karakteristike zbog čega predstavljaju odličan izbor za *in vitro* izolaciju virusa AKS.

Potreban materijal:

1. Svinja (starija od 3 meseca, 20 do 30 kg),
2. Anestetik,
3. Fetalni teleći serum (FBS Gibco, ThermoFisher, SAD),
4. Dimetil sulfoksid (DMSO, ThermoFisher, SAD) ,
5. Skalpel, makaze, kostotom,
6. Sternalni retraktor,
7. Hemostatska klešta i pincete,
8. Boce od 1 litar,
9. Heparin (Hemofarm, Srbija),
10. Levak,
11. Boce od 1l,
12. Sterilne tube zapremine 50ml,
13. RPMI podloga (RPMI, Gibco, ThermoFisher, SAD),
14. Tube of 50 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka),
15. 96 bunarske ploče (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka).

Anestezija i eutanazija životinje:

Anestezija i eutanazija je sprovedena na osnovu Mišljenja etičke komisije za zaštitu dobrobiti Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu (05-3/2023) i Rešenja o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama pod nazivom „Izolacija i genska karakterizacija virusa afričke kuge svinja u Srbiji u periodu 2019-2023. godine“ (01-342/2) Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprave za veterinu.

Svinja je anestezirana kombinovanim tretmanom sa ketaminom (Bayer, Nemačka) (12 mg/kg), midazolamom (Bayer, Nemačka) (0,5 mg/kg) i atropinom (Bayer, Nemačka) (0,03 mg/kg). Dok je eutanazija vršena u skladu sa dobrobiti odnosno iskrvarenje ubodom u ručnoglaveno arterijsko stablo koje je uobičajena metoda komercijanog klanja ove životinjske vrste.

1. Područije sternuma je očišćeno 70 % etanolom i napravljen je rez skalpelom do sternuma.
2. Sternum je isečen kostotomom.
3. Torakalna šupljina je raširena retraktorom radi dobijanja pristupa gornjem delu traheje. Traheja je zatim zatvorena hemostatskim kleštima.

Bronhoalveolarna lavaža:

1. Uklonjena su pluća, srce i dušnik bez skidanja kleme.
2. Odvojeno srce, krvni sudovi i jednjak, a pluća su spolja oprana PBS-om.
3. Pluća su napunjana sa 600 ml PBS-a koji sadrži 10 IU heparina/ml. Ovako napunjena pluća su masirana da bi se tečnost rasporedila u oba režnja.
4. Tečnost iz pluća je zatim izlivena u sterilnu bocu (500 ml).
5. Ispiranje pluća je ponovljeno još dva puta.

6. Dobijena tečnost je čuvana na 4 °C do dopremanja u laboratoriju.

Priprema primarne ćelijske linije:

1. Dobijena tečnost je razlivena u tube zapremine 50 ml.
2. Tube su zatim centrifugirane (MPW Med Instruments, Varšava, Poljska) na 2000 g, na sobnoj temperaturi (20-24 °C).
3. Supernatant je odliven, a ćelije resuspendovane u PBS-u sa heparinom (10 IU/ml).
4. Ispiranje je ponovljeno još dva puta.
5. Supernatant je odliven, a beli sloj "pahuljica" na vrhu ćelijskog peleta je uklonjen uz lagano mešanje uz izbegavanje odvajanja ćelijskog sedimenta koji je sastavljen od ćelijskih ostataka i trombocita.
6. Ćelije su resuspendovane u RPMI podlozi sa 10 % svinjskog seruma i 20 IU heparina/ml.
7. Očekivan broj alveolarnih ćelija je $1,5-2 \times 10^9$, sa < 10 % eritrocitne kontaminacije (koji se lako prepoznaju kao manje sferne ćelije bez jedra). Oko 50 % alveolarnih ćelija su makrofagi.
8. Ćelije su izbrojane primenom Nauberove komorice, a koncentracija podešena na 400 000 ćelija/100 μ l.

Priprema 1 % svinjskih eritrocita u PBS:

1. Izvađeno je 5 ml krvi svinje u epruvetu sa antikoagulansom.
2. Krv je centrifugirana na 1200 g 3 minuta.
3. Krvna plazma je odlivena i dodato je 10 ml fiziološkog rastvora.
4. Krvna plazma je centrifugirana na 1200 g 3 minuta.
5. Supernatant je odliven i dodato je 10 ml fiziološkog rastvora. Postupak je ponovljen još dva puta.
6. Suspenzija eritrocita je napravljena dodavanjem odgovarajuće količine fiziološkog rastvora u suspenziju eritrocita.

Inokulacija:

1. Dobijene ćelije su razlivene u 96 bunarske ploče u količini od 100 μ l/bunaru.
2. Nakon maturacije ćelija u trajanju od 24 h, izvršena je inokulacija sa 10 μ l prethodno pripremljene suspenzije uzoraka (ukupno 22 uzoraka).
3. Posle 24 h doliveno je 10 μ l prethodno pripremljenih svinjskih eritrocita u PBS-u.
4. Ćelije su posmatrane svakog dana pod svetlosnim mikroskopom (Leica, Nemačka).
5. Nakon nedelju dana inokulisane ćelije su zamrznute i odmrznute tri puta, zatim su negativni uzorci podvrgnuti drugoj pasaži, a pozitivni uzorci (CPE ili HAD) testirani na prisustvo genoma virusa Aujeckijeve bolesti (Ma i sar. 2008) zbog diferencijalne dijagnostike.

PRIPREMA PRIMARNE KULTURE TKIVA OD LEUKOCITA SVINJA

Za pripremu kulture tkiva korišćen je sledeći materijal

1. Svinje starije od 3 meseca, 20 do 30 kg,
2. 70 % etanol,
3. Staklene boce od 100 ml sa antikoagulansom i antibioticima (40 IU/ml heparina, 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomicina),
4. Sterilne tube zapremine 50ml,
5. Fosfatni puferski rastvor (PBS),
6. Svinjski serum sa heparinom,
7. Puffer za razgradnju eritrocita (0,83 % amonijum hlorid u destilovanoj vodi),
8. Minimalni esencijalni medijum za ćelijske linije (RPMI),
9. Atraumatske igle (22 G),
10. Užad za vezivanje životinja,
11. Inkubator na 37 °C,
12. Centrifuga sa hlađenjem.

Uzorkovanje krvi:

1. Životinja je položena u leđni položaj, imobilizirana pomoću užadi, držeći glavu ne previše zategnutu unazad kako bi se omogućio protok vazduha kroz traheju.
2. Područje sternuma je dezinfikovano 70 % etanolom.
3. Ubod u krvni sud je vršen atraumatskom iglom veličine 23 G (Gauge, eng.) blizu prvog rebra na sternumu pod uglom od 30°.
4. Napredovanje igle u krvni sud je zaustavljeno po prvoj pojavi krvi u špricu. Zatim je uzeta krv (50 ml) u staklenu bocu od 100 ml u koju je prethodno naliven antikoagulans i antibiotik (40 IU/ml heparina, 100 IU/ml penicilina i 0,1 mg/ml streptomicina).
5. Boca sa krvlju je blago promešana i nagnuta pod uglom od 45° u trajanju od 60 minuta na temperaturi od 37 °C radi sedimentacije većine crvenih krvnih zrnaca.
6. Gornja faza bogata leukocitima je pažljivo sakupljena u bocu od 100 ml i pomešana sa tri puta većom zapreminom (75 ml) PBS-a koji sadrži 20 IU heparina/ml.
7. Ćelije su centrifugirane 5 minuta na 1000 g na sobnoj temperaturi, a zatim je supernatant odliven.
8. Ćelije su resuspendovane u tri puta većoj zapremini (75 ml) PBS-heparina i ispitivanje je ponovljeno još dva puta.

Razgradnja eritrocita:

1. Ćelijski pelet je resuspendovan na ledu u 0,1 % zapremine (2,5 ml) ohlađenog PBS-a (4 °C) sa 5 % svinjskog seruma i dodato je 0,025 % zapremine (0,6 ml) pufera za razgradnju eritrocita uz blago mešanje.
2. Nakon 4 do 5 minuta razgradnja eritrocita je posmatrana zamućenjem rastvora. Leukociti su sakupljeni nakon centrifugiranja u trajanju od 5 min na 1000 g, na temperaturi od 4 °C.
3. Ostaci eritrocita isprani su dva puta resuspendovanjem ćelija u 5 ml DMEM-a sa 5 % svinjskog seruma i 20 IU heparina/ml i centrifugiranjem 5 min na 1000 g i 4 °C.
4. Poslednji ćelijski pelet je resuspendovan u 6 ml DMEM-a sa 10 % svinjskog seruma i 20 IU heparina/ml.

5. Na ovaj način se uobičajeno dobije oko 20×10^6 leukocita/ml, od kojih je oko 6 % monocita.
6. Ovako pripremljene ćelije se mogu zamrzavati ili odmah koristiti.

Inokulacija:

1. Dobijene ćelije su razlivene u 96 bunarske ploče u količini od 100 μ l. Optimalna koncentracija po bunaru iznosi 300 000 leukocita.
2. Nakon maturacije leukocita u trajanju 24-48 h, ćelije su inokulisane sa 10 μ l prethodno pripremljene suspenzije uzoraka (ukupno 20 uzoraka).
3. Posle 24 h doliveno je 10 μ l prethodno pripremljenih svinjskih eritrocita u PBS.
4. Inokulisane ćelije su posmatrane svakog dana pod svetlosnim mikroskopom radi praćenja pojave hemadsorpcionog i/ili citopatogenog efekta.
5. Nakon nedelju dana ćelije su zamrznute i odmrznute tri puta, a negativni uzorci stavljeni na drugu pasažu. Uzorci okarakterisani kao pozitivni su testirani real time PCR metodom u cilju isključivanja infekcije virusom Aujeckijeve bolesti (Ma i sar. 2008).

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA:

Broj uzoraka po okrugu i vrsti je određen upotrebom platforme Epitools (Ausvet, Australija, <https://epitools.ausvet.com.au/randomnumbers>) i primenom opcije nasumičnog izbora uzoraka iz okvira uzorkovanja.

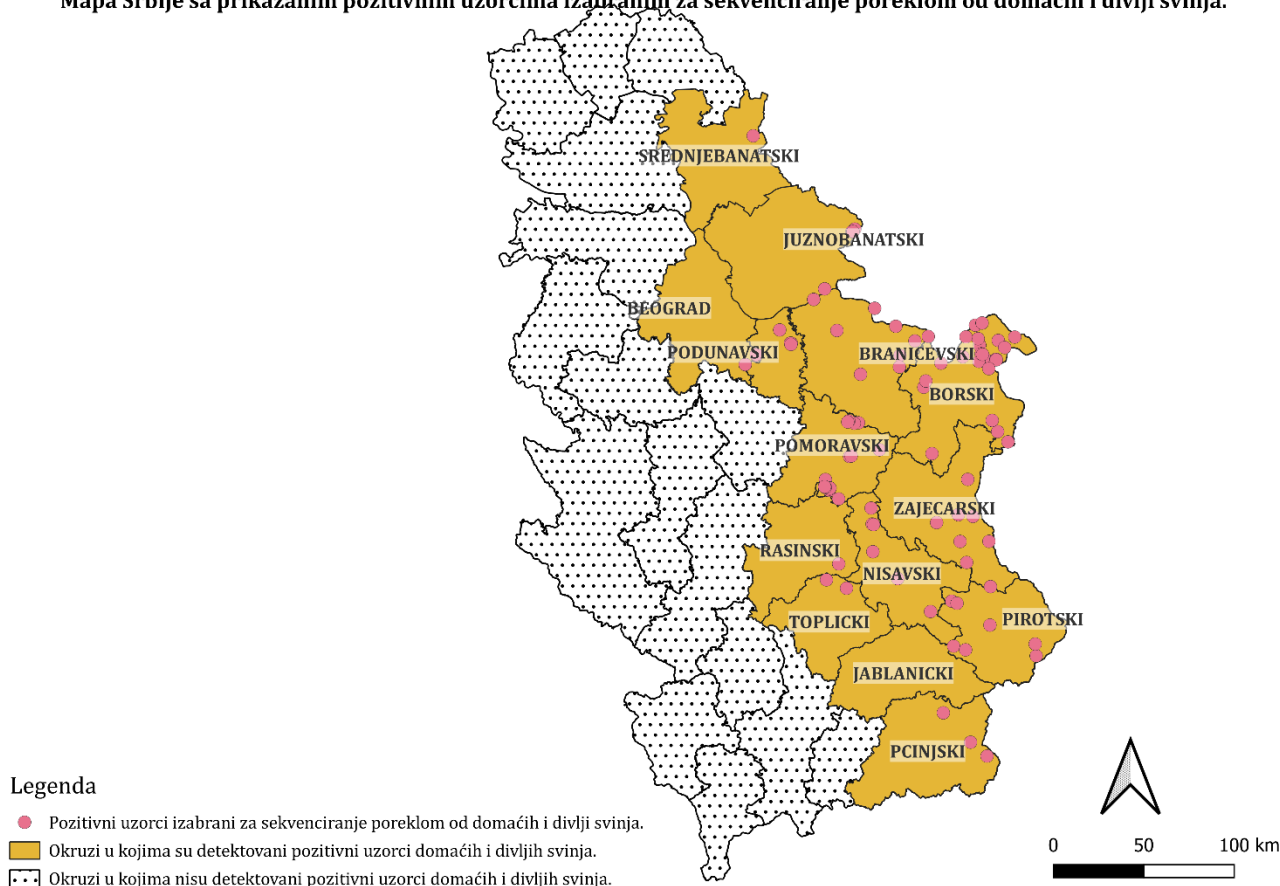
Prostorno-vremenska analiza i izrada mapa je izvršena upotrebom DIVA-GIS (<https://www.diva-gis.org/>) i SaTScan (<https://www.satscan.org/>) programskih paketa. Koordinate korišćene u analizi kao i za izradu mapa su dobijene od Republičke veterinarske inspekcije.

Za prostorno vremensku analizu korišćen je programski paket SatScan na sledeći način: kreiran je CaseFile; uzorcima su dodeljeni generisani Id brojevi; kreiran je dokument sa podacima o geografskoj širini i dužini za svaki uzorak; period proučavanja (*Study period*, eng.) je podešen od 2020. do 2023. godine; vremenska preciznost (*Time precision*, eng.) je podešena na godinu dana; izabran je prostorno-vremenski (*Space-Time*, eng.) tip analize; model verovatnoće je podešen na prostorno-vremensku permutaciju (*Space-time permutation*, eng.); način skeniranja je podešen na visoke stope (*High rates*, eng.); simulacija za izračunavanje p vrednosti je podešena na Monte-Karlo metod zasnovan na hipotezi nulte raspodele tj. odsustvu klastera. Kriterijum za sekundarne klastere je podešen tako da nema centra jednog klastera u drugom klasteru. Uzorci iz 2019. godine nisu korišćeni u analizi zato što nije bilo pozitivnih uzorka kod divljih svinja.

REZULTATI

Od 454 uzorka koji su reagovali pozitivno na real time PCR izabrano je 95 uzoraka sa Ct vrednošću ispod 25 za sekvenciranje i filogenetsku analizu (Mapa 1.). Od 95 ispitanih uzoraka, kod 64 (67,4 %) uzorka uspešno su amplifikovana i sekvencirana sva četiri molekularna markera (Tabela 16). Od 95 ispitanih uzoraka kod 5 (5,3 %) uspešno su amplifikovana i sekvencirana tri dela genoma (B646L, E183L i B602L). Od 95 ispitanih uzoraka kod 11 (11,6 %) uspešno su amplifikovani i sekvencirani B646L i E183L delovi genoma, a kod tri (3,2 %) uzorka uspešno su amplifikovani i sekvencirani samo B646L i B602L gen, takođe kod tri (3,2 %) uzorka uspešno su amplifikovani i sekvencirani samo E183L i B602L geni. Od 95 ispitanih uzoraka kod dva (2,1 %) je izvršena samo amplifikacija i sekvenciranje B646L gena, kod 6 (6,3 %) je izvršena amplifikacija i sekvenciranje samo E183L gena, kod 1 (1,1 %) je izvršena amplifikacija i sekvenciranje samo B602L gena.

Mapa Srbije sa prikazanim pozitivnim uzorcima izabranim za sekvenciranje poreklom od domaćih i divlji svinja.



Mapa 1. Mapa Srbije sa prikazanim pozitivnim uzorcima izabranim za sekvenciranje poreklom od domaćih i divljih svinja u periodu od 2019. do 2023. godine.

Tabela 16. Spisak sekvenciranih uzoraka sa pristupnim brojevima u NCBI.

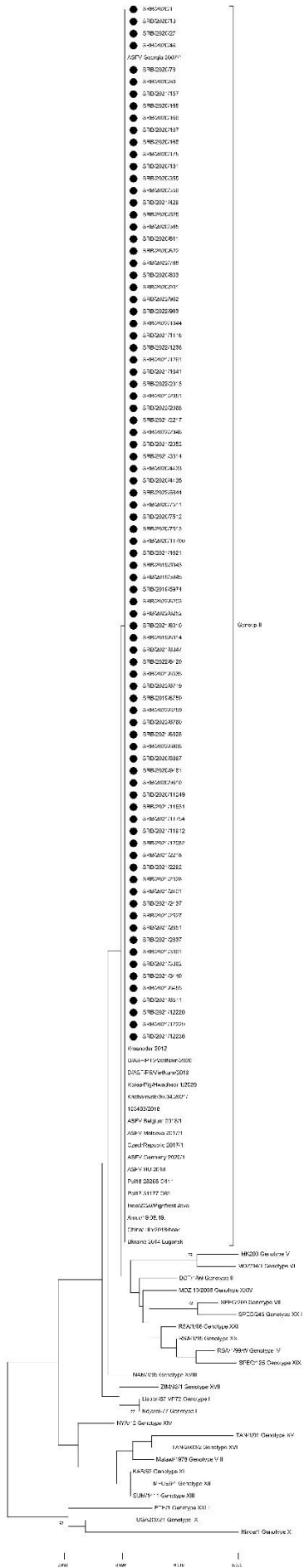
<i>Naziv soja</i>	<i>Vrsta</i>	<i>Okrug</i>	<i>Pristupni broj NCBI B646L gen</i>	<i>Pristupni broj NCBI E183I gen</i>	<i>Pristupni broj NCBI B602L gen</i>	<i>Pristupni broj NCBI IGR</i>
SRB/2020/1	Divlja svinja	Pirotski	OQ336124	OQ335972	OQ336062	OQ336193
SRB/2020/13	Divlja svinja	Borski	OQ336125	OQ335973	OQ336063	OQ336194
SRB/2020/27	Divlja svinja	Nišavski	OQ336126	OQ335974	OQ336115	OQ336207
SRB/2020/46	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336127	OQ335975	OQ336088	OQ336195
SRB/2020/78	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336128	OQ335976	OQ336119	OQ336216
SRB/2020/80	Divlja svinja	Borski	OQ336129	OQ335977	OQ336120	OQ336244
SRB/2021/157	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336130	OQ335978	OQ336074	OQ336217
SRB/2020/166	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336132	OQ335979	OQ336066	OQ336218
SRB/2020/167	Domaća svinja	Borski	OQ336133	OQ335980	OQ336076	OQ336209
SRB/2020/168	Domaća svinja	Nišavski	OQ336134	OQ335981	OQ336077	OQ336210
SRB/2020/175	Domaća svinja	Jablanički	OQ336135	OQ335982	OQ336078	OQ336211
SRB/2022/181	Divlja svinja	Borski	OQ336136	OQ335984	OQ336079	OQ336213
SRB/2021/190	Divlja svinja	Zaječarski		OQ335985		
SRB/2022/202	Domaća svinja	Borski		OQ335986		
SRB/2020/355	Divlja svinja	Jablanički	OQ336137	OQ335987		
SRB/2020/356	Domaća svinja	Jablanički	OQ336138	OQ335988	OQ336084	
SRB/2021/429	Divlja svinja	Nišavski	OQ336139	OQ335989	OQ336086	OQ336221
SRB/2020/525	Domaća svinja	Borski	OQ336140	OQ335990	OQ336090	OQ336226
SRB/2020/585	Divlja svinja	Rasinski	OQ336141	OQ335991	OQ336095	OQ336222
SRB/2020/611	Domaća svinja	Borski	OQ336142	OQ335992	OQ336100	OQ336253
SRB/2022/777	Divlja svinja	Braničevski	OQ336131	OQ335993	OQ336118	OQ336250
SRB/2020/833	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336145	OQ335994	OQ336122	OQ336245
SRB/2020/931	Divlja svinja	Rasinski	OQ336146	OQ335995	OQ336092	OQ336249
SRB/2022/962	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336147	OQ335996	OQ336080	OQ336247
SRB/2022/963	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336148	OQ335997	OQ336108	OQ336248
SRB/2022/1041	Divlja svinja	Braničevski	OQ336003	OQ335998		
SRB/2022/1044	Domaća svinja	Podunavski	OQ336149	OQ335999	OQ336064	OQ336198
SRB/2020/1116	Divlja svinja	Braničevski	OQ336150	OQ336000	OQ336067	OQ336223
SRB/2022/1238	Divlja svinja	Braničevski	OQ336151	OQ336001	OQ336071	OQ336204
SRB/2021/1261	Domaća svinja	Pomoravski	OQ336152	OQ336002	OQ336072	OQ336205
SRB/2022/1520	Domaća svinja	Pomoravski	OQ336143	OQ336004	OQ336073	OQ336206
SRB/2021/1641	Divlja svinja	Borski	OQ336153	OQ336005	OQ336075	OQ336208
SRB/2022/2013	Divlja svinja	Jablanički	OQ336154	OQ336006	OQ336111	OQ336196
SRB/2022/2068	Divlja svinja	Braničevski	OQ336156	OQ336007	OQ336070	OQ336215
SRB/2021/2217	Divlja svinja	Braničevski	OQ336157	OQ336008	OQ060635	
SRB/2021/2218	Divlja svinja	Braničevski	OQ060619	OQ336003		
SRB/2021/2328	Divlja svinja	Pirotski	OQ060621	OQ336009	OQ060637	OQ336219
SRB/2021/2292	Domaća svinja	Rasinski	OQ060620		OQ060636	
SRB/2022/2346	Divlja svinja	Borski	OQ336158	OQ336010		
SRB/2021/2352	Domaća svinja	Pomoravski	OQ336159	OQ336011	OQ336082	OQ336220
SRB/2021/2401	Divlja svinja	Rasinski	OQ060622	OQ336012	OQ060638	OQ336197
SRB/2021/2347	Domaća svinja	Rasinski	OQ060623	OQ336013	OQ060639	OQ336256
SRB/2021/2651	Domaća svinja	Rasinski	OQ060625	OQ336014	OQ060641	OQ336255
SRB/2021/2837	Domaća svinja	Borski	OQ060626	OQ336015	OQ060642	OQ336212
SRB/2021/3314	Domaća svinja	Zaječarski	OQ336160	OQ336016	OQ336083	OQ336224
SRB/2021/3391	Domaća svinja	Zaječarski	OQ060627	OQ335983	OQ060643	OQ336254
SRB/2021/3392	Divlja svinja	Južnobanatski	OQ060628	OQ336017	OQ060644	OQ336214

SRB/2021/3449	Domaća svinja	Pčinjski	OQ060629	OQ336018	OQ060645	OQ336251
SRB/2020/4433	Domaća svinja	Pirotski	OQ336161	OQ336019		
SRB/2020/4435	Domaća svinja	Pirotski	OQ336162	OQ336020	OQ336087	OQ336225
SRB/2021/5003	Divlja svinja	Braničevski	OQ060624	OQ336021		
SRB/2021/5005	Domaća svinja	Braničevski		OQ336022	OQ336090	
SRB/2021/5431	Domaća svinja	Braničevski	OQ336192		OQ336093	
SRB/2022/5844	Domaća svinja	Pčinjski	OQ336163	OQ336023	OQ336094	OQ336227
SRB/2019/5943	Domaća svinja	Grad Beograd	OQ336169	OQ336024	OQ336096	OQ336229
SRB/2019/5945	Domaća svinja	Grad Beograd	OQ336170	OQ336025	OQ336097	OQ336230
SRB/2019/5974	Divlja svinja	Južnobanatski	OQ336171			
SRB/2019/6022	Domaća svinja	Grad Beograd	OQ336144	OQ336026	OQ336098	OQ336231
SRB/2019/6034	Domaća svinja	Grad Beograd	OQ336168	OQ336027	OQ336099	OQ336232
SRB/2022/6177	Domaća svinja	Južnobanatski		OQ336028	OQ336101	
SRB/2022/6203	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336172	OQ336029	OQ336103	OQ336233
SRB/2022/6252	Domaća svinja	Nišavski	OQ336173	OQ336030	OQ336104	OQ336201
SRB/2022/6298	Domaća svinja	Braničevski		OQ336031		
SRB/2021/6310	Divlja svinja	Podunavski	OQ336174	OQ336032	OQ336085	OQ336234
SRB/2019/6314	Divlja svinja	Grad Beograd	OQ336175	OQ336033	OQ336105	OQ336235
SRB/2021/6347	Divlja svinja	Borski	OQ336176	OQ336034	OQ336106	OQ336236
SRB/2022/6429	Domaća svinja	Zaječarski	OQ336177	OQ336036	OQ336107	OQ336237
SRB/2021/6455	Divlja svinja	Nišavski	OQ060630	OQ336037	OQ060646	OQ336238
SRB/2022/6457	Divlja svinja	Braničevski		OQ336038		
SRB/2021/6511	Domaća svinja	Jablanički	OQ060631	OQ336039	OQ060647	OQ336252
SRB/2021/6535	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336178	OQ336040	OQ336109	OQ336200
SRB/2022/6719	Divlja svinja	Južnobanatski	OQ336179	OQ336041	OQ336110	OQ336239
SRB/2019/6759	Domaća svinja	Srednjobanatsk	OQ336180	OQ336042	OQ336113	OQ336228
SRB/2022/6759	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336181	OQ336043	OQ336112	OQ336240
SRB/2022/6760	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336182	OQ336044	OQ336081	OQ336205
SRB/2021/6828	Divlja svinja	Južnobanatski	OQ336183	OQ060624		
SRB/2022/6896	Domaća svinja	Južnobanatski	OQ336184	OQ336045	OQ336114	OQ336241
SRB/2020/7511	Domaća svinja	Rasinski	OQ336164	OQ336047	OQ336116	OQ336242
SRB/2020/7512	Domaća svinja	Rasinski	OQ336165	OQ336048	OQ060640	
SRB/2020/7513	Domaća svinja	Rasinski	OQ336166	OQ336049	OQ336117	OQ336243
SRB/2021/8063	Domaća svinja	Podunavski		OQ336050	OQ336121	
SRB/2020/8897	Domaća svinja	Braničevski	OQ336185	OQ336051		
SRB/2020/9481	Domaća svinja	Podunavski	OQ336186	OQ336052		
SRB/2020/9610	Domaća svinja	Podunavski	OQ336187	OQ336053		
SRB/2020/11049	Divlja svinja	Zaječarski	OQ336188	OQ336054	OQ336065	
SRB/2020/11051	Divlja svinja	Zaječarski		OQ336055		
SRB/2021/11631	Domaća svinja	Nišavski	OQ336189	OQ336056	OQ336068	
SRB/2020/11700	Domaća svinja	Borski	OQ336167	OQ336057		
SRB/2021/11754	Domaća svinja	Braničevski	OQ336190	OQ336058	OQ336069	OQ336199
SRB/2021/11912	Divlja svinja	Braničevski			OQ336089	
SRB/2021/12082	Divlja svinja	Pčinjski		OQ336059		
SRB/2021/12220	Divlja svinja	Braničevski	OQ060632	OQ336060	OQ060648	OQ336202
SRB/2021/12229	Divlja svinja	Braničevski	OQ060633	OQ336061	OQ060649	OQ336203
SRB/2021/12236	Divlja svinja	Braničevski	OQ060634		OQ060650	
SRB/2021/12082	Divlja svinja	Braničevski	OQ336191			

FILOGENETSKA ANALIZA C-TERMINALNOG DELA B646L GENA

Sekvence iz ove studije su poređene sa drugim sekvencama iz NCBI baze podataka (tabela 11). Nukleotidne sekvence su deponovane u banku gena Nacionalnog centara za biotehnoške informacije (NCBI GenBank, Maryland, SAD) pod brojevima OQ336124–OQ336192 i OQ060619–OQ060634 (tabela 16).

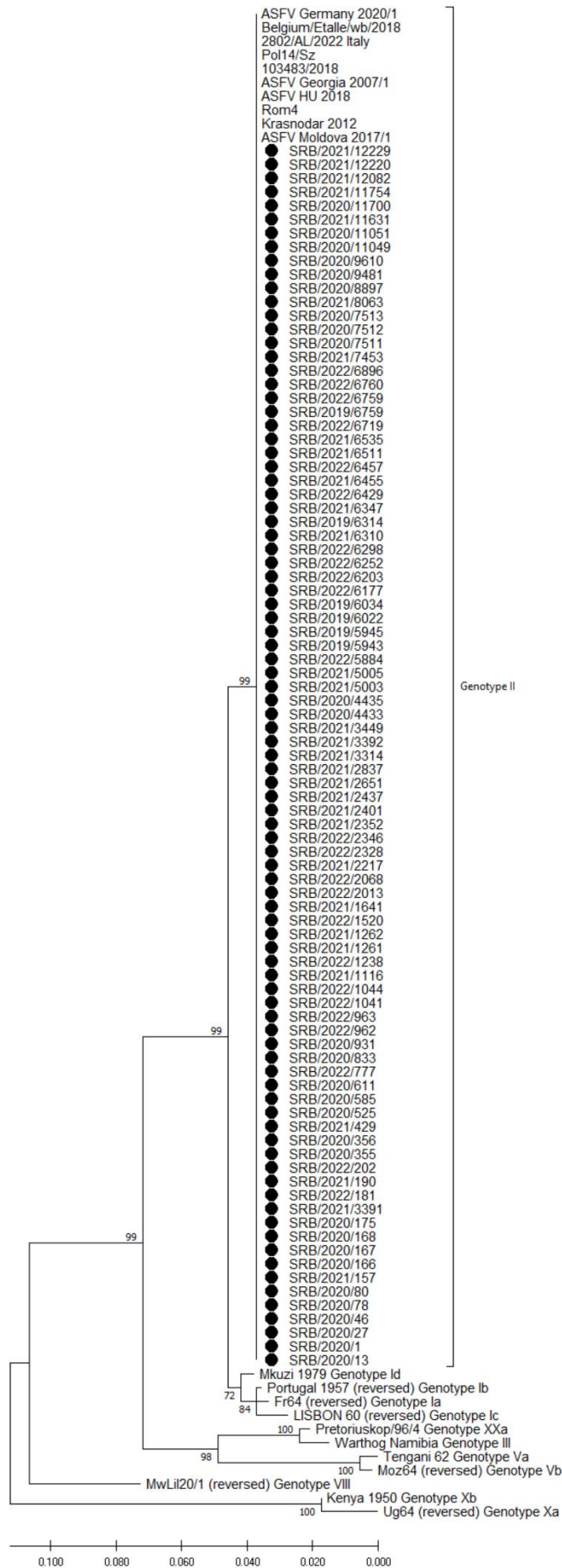
Filogenetskom analizom je utvrđeno da svi uzorci AKS iz Srbije pripadaju genotipu II čiji je referentni predstavnik soj Georgia 2007/1 (FR682468.2) (slika 3).



Slika 3. Na slici su prikazani filogenetski odnosi između parcijalnih B646L sekvenci iz ove studije (OQ336124-OQ336192 i OQ060619-OQ060634) i drugih sojeva preuzetih iz NCBI baze podataka (tabela 11). Analiza je izvedena u MEGA X softveru primenjujući algoritam Maksimalne Verovatnoće i Jukes-Cantor model, sa 1000 „bootstrap“ ponovaka. Vrednosti manje od 70 nisu prikazane.

FILOGENETSKA ANALIZA E183L GENA

Od 95 sekvenciranih sojeva, dobijeno je 89 (93,7 %) sekvenci visokog kvaliteta. Sekvence analizirane u ovoj studiji (OQ335972-OQ336061) (tabela 16) su poređene sa odgovarajućim sekvencama iz NCBI baze podataka (tabela 12). Sekvence AY261360, AY261362, AY261363, AY261364, AY261366, FJ174420, FJ174421, FJ174422, FJ174425, FJ174430, FR682468 i X84889 su dodate kao sekvence koje predstavljaju različite podgenotipove koji se mogu diferencirati sekvenciranjem E183L gena i predstavljaju sekvence izvan grupe genotipova I, V, VIII, X. Genskom analizom nisu ustanovljene mutacije u ovom delu genoma kod lokalnih sojeva, a svi sojevi AKS sojevi su grupisani unutar genotipa II (Slika 4).



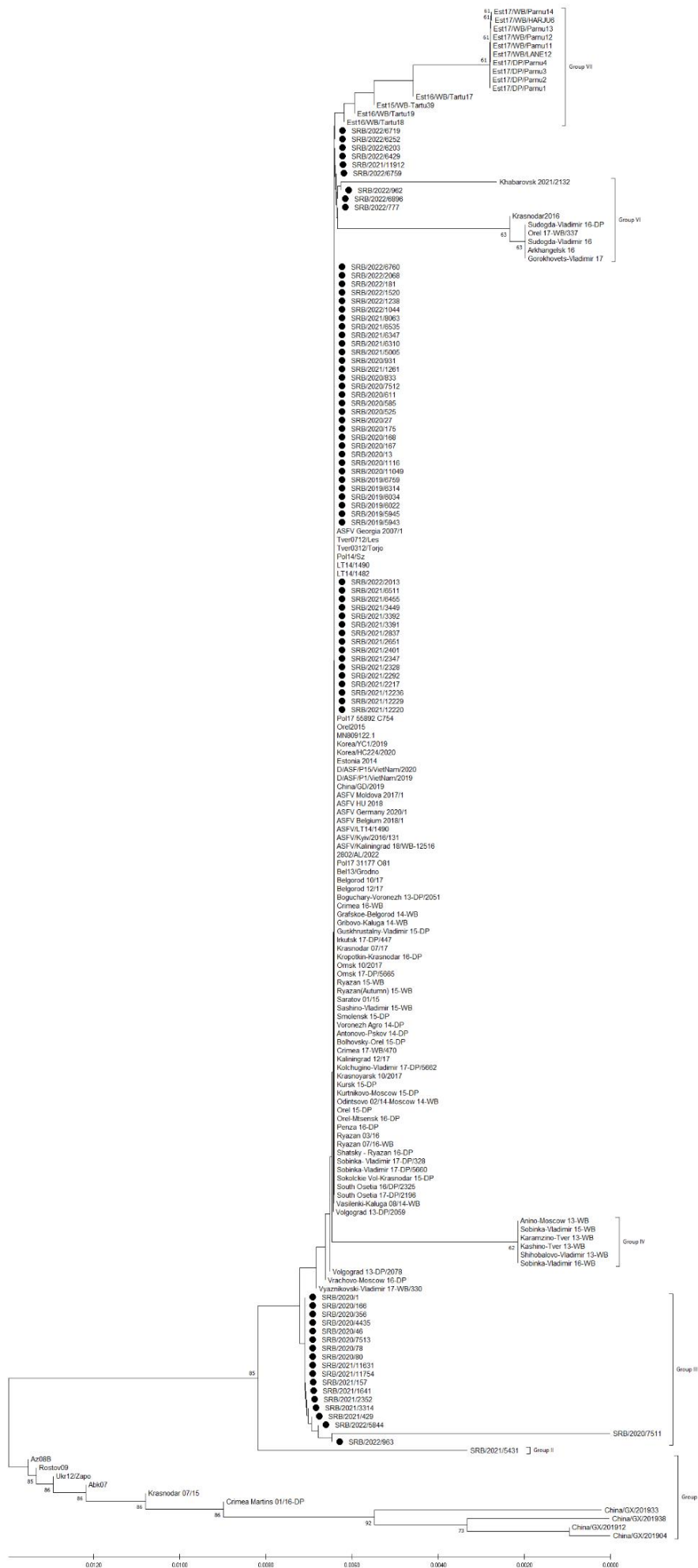
Slika 4: Filogenetsko stablo na osnovu E183L sekvenci iz ove studije (OQ335972—OQ336061) i sekvenci preuzetih iz NCBI baze podataka (tabela 12). Analiza je izvedena u MEGA X softveru korišćenjem algoritma Maksimalne Verovatnoće i Jukes-Cantor model. U analizu je uključeno 1000 bootstrap ponovaka i uniformna brzina između mesta Gama distribucije (+ G) sa 5 kategorija brzine. Vrednosti niže od 70 nisu prikazane. Sojevi iz ove studije su obeleženi crnim tačkama

FILOGENETSKA ANALIZA CVR UNUTAR B602L GENA

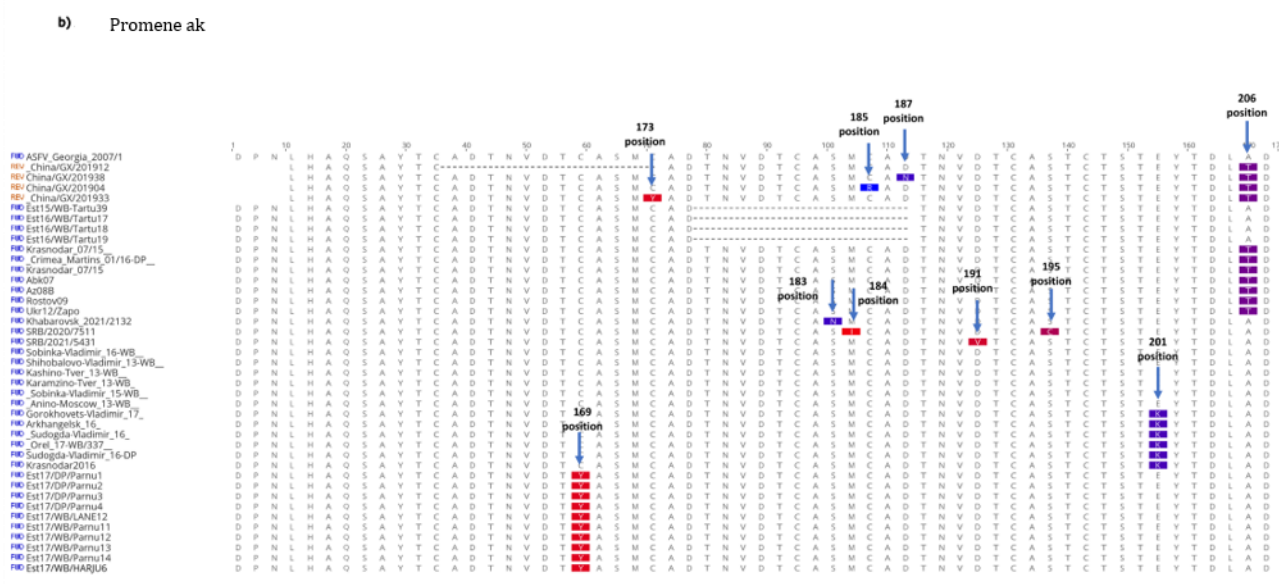
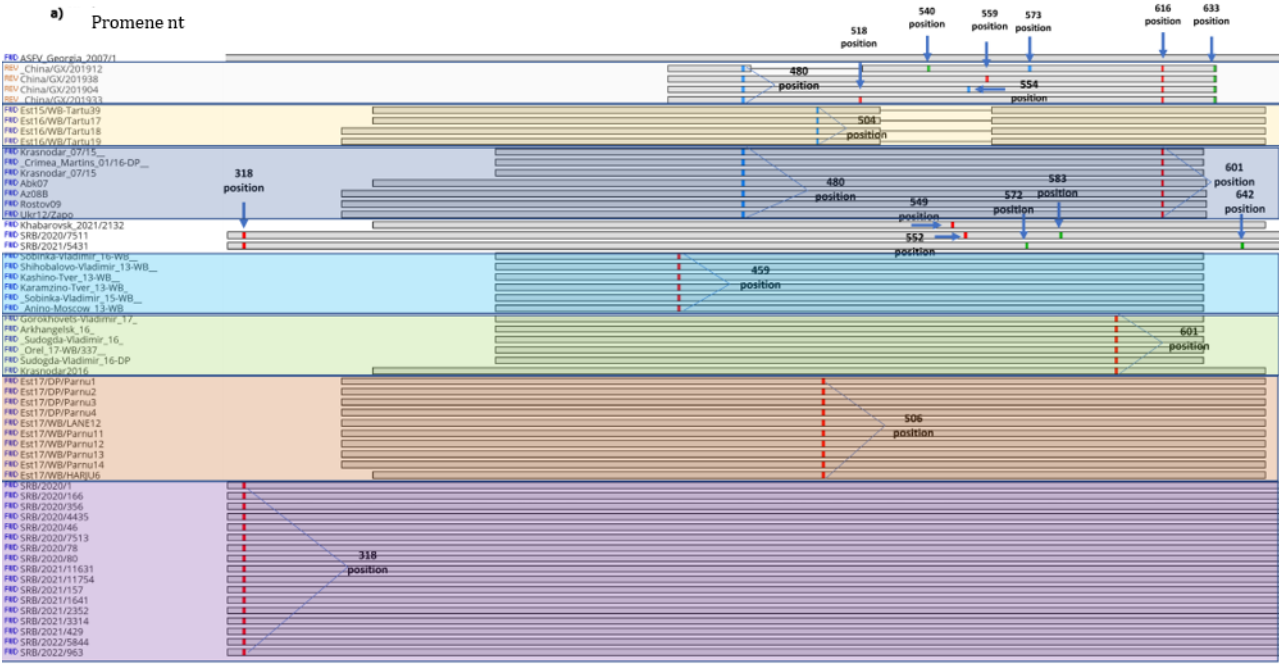
Od 95 uzoraka, visoko-kvalitetne sekvence CVR regiona B602L gena dobijene su za 76 sojeva (80 %). Sekvence su deponovane u NCBI GenBank pod pristupnim brojevima OQ336062-OQ336123 i OQ060635-OQ060650 (tabela 16). CVR sekvence dobijene iz sojeva u ovoj studiji su poređene sa 104 sekvence genotipa II virusa AKS preuzete iz NCBI baze podataka (Tabela 11). Filogenetskom analizom se na osnovu B602L gena može razlikovati šest podgrupa virusa (Slika 5). Sojevi iz ove studije svrstavaju se u četiri različite podgrupe. Većina sojeva je grupisana zajedno sa referentnim sojem ASFV Georgia 2007/1 (podgrupa I). Soj SRB/2021/5431 pripada zasebnoj podgrupi (podgrupa II). Ostali sojevi iz ove studije sa promenom T318A grupisani su u podgrupu III. Tri soja iz ove studije su grupisani u podgrupu IV.

ANALIZA MUTACIJA B602L GENA

Od 76 sekvenci koje su korišćene u analizi B602L gena, kod 16 (21.1 %) je ustanovljena sinonimna mutacija T318A u okviru B602L gena. Kod soja SRB/2020/7511 pronađene su tri promene nukleotida. Jedna od njih je sinonimna T318A, dok je druga nesinonimna G522A što je rezultiralo u promeni aminokiseline Met184Ile u aminokiselinskoj sekvenci B602L gena. Treća nesinonimna promena T583A je dovela do promene Cis195Ser aminokiselinske sekvence B602L gena. Ove promene su prikazane na slici 5. Zamena metionina izoleucinom i cisteina serinom u soju SRB/2020/7511 nije dovela do promene polariteta bočnog lanca aminokiseline. Kod SRB/2021/5431 ustanovljene su dve nukleotidne promene, sinonimna T572A i nesinonimna T642C promena nukleotida što je rezultiralo Asn191Val u aminokiselinskoj sekvenci. Zamena asparaginske amino kiseline valinom u SRB/2021/5431 dovela je do promene polariteta bočnog lanca proteina (slika 6). Ostalih 60 sojeva je u potpunosti podudarno sa referentnim sojem ASFV Georgia 2007/1 (FR682468.2).



Slika 5. Filogenetsko stablo na osnovu B602L gena lokalnih sojeva (OQ336062-OQ336123 i OQ060635-OQ060650) i sekvenci preuzetih iz NCBI (Tabela 13.). Za analizu je korišćen algoritam maksimalne verodostojnosti i Jukes-Cantor model u softveru MEGA X. Analiza je uključivala 1000 bootstrap replikacija i uniformnu stopu među mestima Gama raspodele (+ G) sa 5 kategorija stopa. Vrednosti niže od 70 nisu prikazane. Sekvence iz Srbije su označene crnim tačkama.

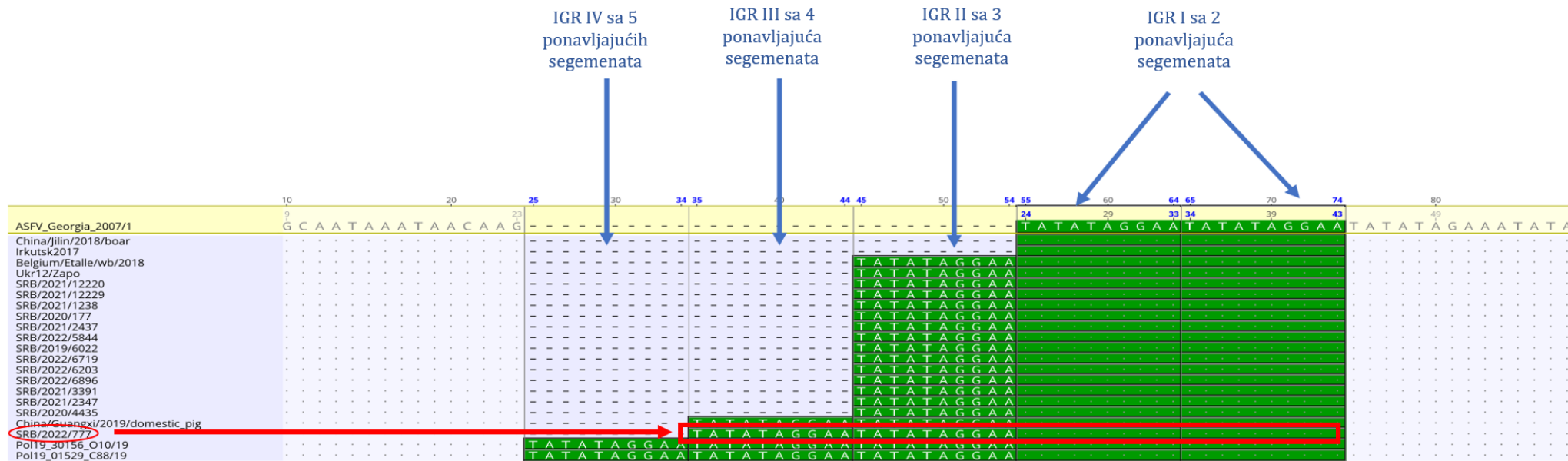


Slika 6. A) Promene nukleotida (nt) unutar CVR parcijalnog B602L gena. Sekvence su poređene sa referentnim sojem ASFV Gruzija 2007/1. Formirane su različite grupe na osnovu promena koje su ustanovljene u parcijalnim sekvencama B602L gena. Ukupno je osam različitih grupa koje su obojene različitim bojama.

B) Promene aminokiselina (ak) unutar CVR parcijalne B602L aminokiselinske sekvence u poređenju sa referentnim sojem ASFV Gruzija 2007/1.

ANALIZA MUTACIJA IZMEĐU I73R i I329L GENA

Od 64 sekvence korišćene u analizi, kod sedam (10,9 %) sekvenci je zabeležena insercija 245T, dok je kod šest (9,4 %) zabeležena nesinonimna mutacija C54A. Kod 63 (98,6 %) sekvence zabeležno je prisustvo tri ponavljajuća „TATATAGGAA“ segmenta što omogućava klasifikaciju ovih sojeva u IGR II grupu, a kod soja SRB 2022/777 prisustvo četiri „TATATAGGAA“ segmenta što omogućava klasifikaciju ovog soja u IGR - III grupu (Slika 7).

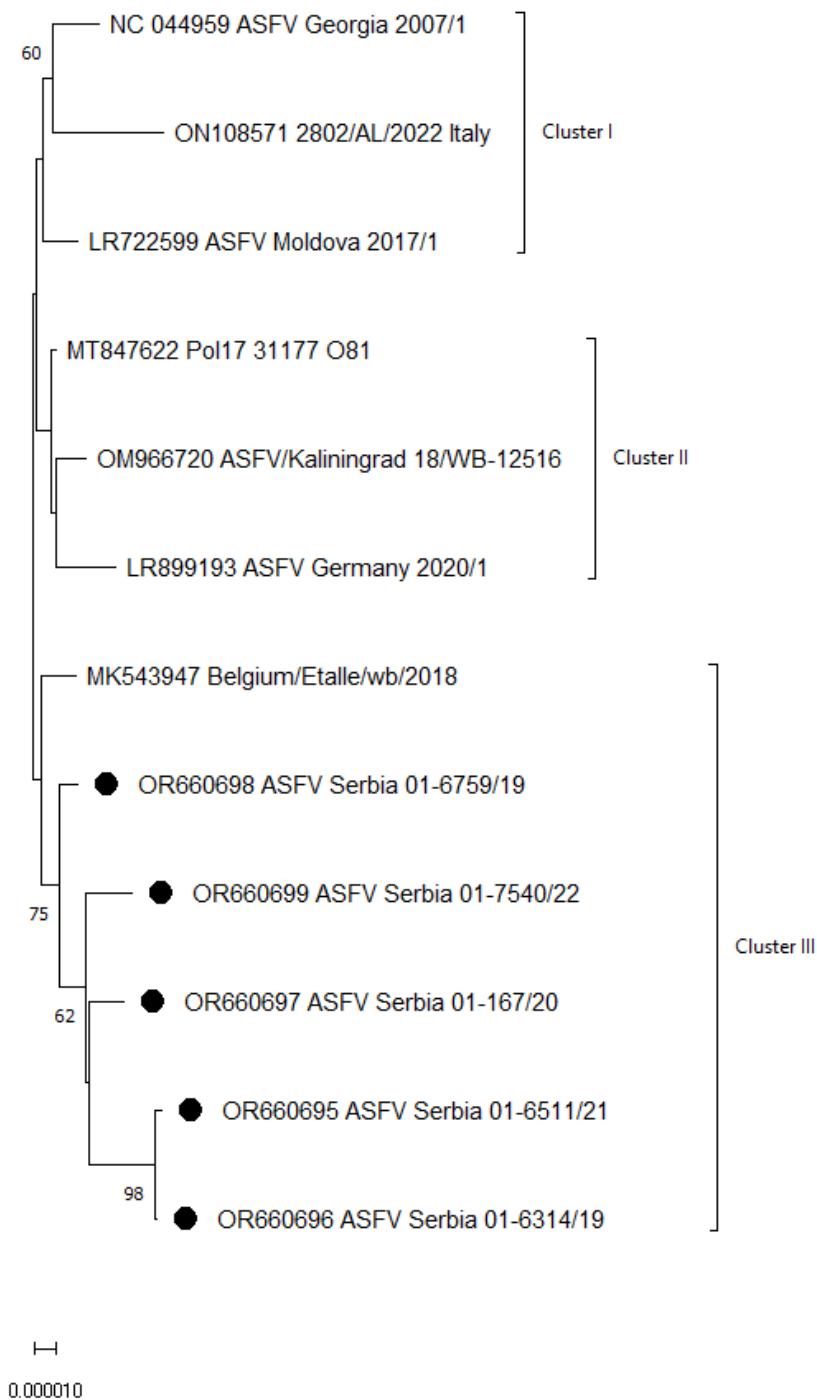


INTERGENSKI REGION IZMEĐU I73R - I329L GENA.

Slika 7. Poređenje svih podgenotipa IGR I73R i I329L gena (I-IV) sa sekvencama preuzetim iz NCBI (Tabela 14.) Crvenom bojom je označen soj SRB 2022/777 koji pripada podgenotipu IGR III.

FILOGENETSKA ANALIZA CELIH GENOMA

Od svih pet uzoraka koji su izabrani za sekvenciranje celog genoma dobijene su visoko kvalitetne sekvence. Sekvence su deponovane u NCBI GenBank i dodeljeni su im pristupni brojevi OR660695 - OR660699. Sekvence dobijene u ovoj studiji su poređene sa 7 sekvenci celih genoma preuzetih iz NCBI (tabela 15). Filogenetskom analizom se mogu razlikovati tri podgrupe sojeva. Sojevi NC044959, ON108571, LR722599 pripadaju prvoj podgrupi, sojevi MT847622, MT847622, LR899193 se izdvajaju u drugu podgrupu, dok su se sojevi iz ove studije izdvojili u treću podgrupu zajedno sa MK543947 sojem (slika 8). Distance sekvenci celih genoma korišćenih u filogenetskoj analizi date su u tabli 17.



Slika 8. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu celih genoma lokalnih sojeva (OR660695-99) i sekvenci preuzetih iz NCBI (tabela 13.) korišćenjem algoritma maksimalne verodostojnosti i Tamura-Nei modela u softveru MEGA X. Analiza je uključivala 1000 bootstrap replikacija i uniformnu stopu među mestima Gama raspodele (+ G) sa 5 kategorija stopa. Vrednosti niže od 60 nisu prikazane. Sekvence iz Srbije su označene crnim tačkama.

ANALIZA SEKVENCI CELOG GENOMA VIRUSA AKS

Analizom nukleotidnih sekvenci celih genoma ustanovljene su promene u različitim genima u odnosu na nukleotidnu sekvencu referentnih sojeva NC044959 (ASFV Georgia 2007/1) i LR899193 (ASFV Germany 2020/1).

Analizom soja OR660695 (SRB 6511/21) ustanovljenje su sledeće promene:

1. Četiri nesinonimne mutacije u okviru ACD00190 gena i to T12577A, A12578T, G12580A, A12581G koje su dovele do promene i to Tyr6Ile i Ser5Leu u kodirajućem delu ACD00190 gena. Promena aminokiseline tirozin u izoleucin ne dovodi do promene u polaritetu lanca, iako tirozin ima fenolnu strukturu u svom bočnom lancu, dok izoleucin nema. Promena serina u leucin dovodi do promena polariteta budući da je serin polarna aminokiselina sa hidroksilnom grupom u bočnom lancu, a leucin nepolarna hidrofobna aminokiselina.
2. Nesinonimna mutacija u okviru ACD00210 gena i to C13596T koja je dovela do promene u aminokiselinskom nizu i to Ser43Pro u kodirajućem delu ADC00210 gena. Promena serina u prolin čini promenu polarne aminokiseline sa hidroksilnom grupom u bočnom lancu u nepolarnu aminokiselinu sa cikličnom strukturom u bočnom lancu.
3. Sinonimna mutacija u okviru NP1450L gena i to G133527A koja ne dovodi do promene u aminokiselinskom nizu.
4. Nesinonimna mutacija u okviru I215L gena T174906C koja rezultira promenom u Glu80Gly u kodirajućem delu gena. Promena glutamina u glicin može rezultirati promenom u naelektrisanju aminokiselinskog lanca s obzirom da je glutamin polarna nenaelektrisana aminokiselina, a glicin nepolarna alifatična aminokiselina.
5. Delecija niza "TTTTTCAGTAGTGA"129301-129314 u okviru gena O174L.
6. Sinonimna mutacija C186895T u okviru MGF 360-19Ra gena praćena promenom Ala213Val.

Analizom soja OR660696 (SRB 6314/19) ustanovljenje su sledeće promene:

1. Insercija na poziciji 12522A sa promenom Ile9Leu u kodirajućem delu gena ACD00190.
2. Četiri nesinonimne mutacije u okviru ACD00190 gena i to T12577A, A12578T, G12580A, A12581G koje su dovele do promene u nizu i to Tyr6Ile i Ser5Leu u kodirajućem delu ACD00190 gena. Promena aminokiseline tirozin u izoleucin ne dovodi do promene u polaritetu aminokiselinskog lanca, iako tirozin ima fenolnu strukturu u svom bočnom lancu, dok izoleucin nema. Promena serina u leucin dovodi do promena polariteta s obzirom da je serin polarna aminokiselina sa hidroksilnom grupom u bočnom lancu, a leucin nepolarna hidrofobna aminokiselina.
3. Nesinonimna mutacija u okviru ACD00210 gena i to C13596T koja je dovela do promene u aminokiselinskom nizu i to Ser43Pro u kodirajućem delu ADC00210 gena. Promena serina u prolin čini promenu polarne aminokiseline sa hidroksilnom grupom u bočnom lancu u nepolarnu sa cikličnom strukturom u bočnom lancu.
4. Sinonimna mutacija u okviru NP1450L gena i to G133527A koja ne dovodi do promene u aminokiselinskom nizu.
5. Nesinonimna mutacija u okviru I215L gena T174906C koja rezultira promenom u Glu80Gly u kodirajućem delu gena. Promena glutamina u glicin može rezultirati promenom u naelektrisanju aminokiselinskog lanca s obzirom da je glutamin polarna nenaelektrisana aminokiselina, a glicin nepolarna alifatična aminokiselina.

6. Nesinonimna mutacija C186895T u okviru MGF 360-19Ra gena praćena promenom Ala213Val.
7. Poli C insercija na poziciji 15672-15676 u intergenskom regionu.

Analizom soja OR660697 (SRB 167/20) ustanovljenje su sledeće promene:

1. Potpuna delecija gena L60L 5273del5413.
2. Nesinonimna mutacija u okviru ACD00210 gena i to C13596T koja je dovela do promene u aminokiselinskom nizu i to Ser43Pro u kodirajućem delu ADC00210 gena. Promena Serina u Prolin čini promenu polarne aminokiseline sa hidroksilnom grupom u boćnom lancu u nepolarnu sa cikličnom strukturom u boćnom lancu.
3. Nesinonimna mutacija u okviru K145R gena i to A66065G koja je dovela do promene u aminokiselinskom nizu i to Ile157Met.
4. Sinonimna mutacija u okviru NP1450L gena i to G133527A koja ne dovodi do promene u aminokiselinskom nizu.
5. Nesinonimna mutacija u okviru I215L gena T174906C koja rezultira promenom u Glu80Gly u kodirajućem delu gena. Promena glutamina u glicin može rezultirati promenom u naelektrisanju aminokiselinskog lanca s obzirom da je glutamin polarna nenaelektrisana aminokiselina, a glicin nepolarna alifatićna aminokiselina.
6. Delecija u nekodirajućem delu na mestima 11919-11948, 17787-17850, 21796-21802, 45134-45159 i 165144-165200.

Analizom soja OR660698 (SRB 6759/19) ustanovljenje su sledeće promene:

1. Insercija Poly CCCC regiona na poziciji 14123-141238 u okviru MGF 110-114 proteina koja je rezultirala promenom u aminokiselinskom nizu sa insercijom dva 63Glu 64Glu .
2. Nesinonimna mutacija u okviru E120R gena koja rezultira promenom Leu75Pro u kodirajućem delu gena.

Analizom soja OR660699 (SRB 7540/22) ustanovljenje su sledeće promene:

1. Nesinonimna mutacija u okviru gena ACD 00210 C13591T koja rezultira promenom u Pro39Ser u kodirajućem delu genoma. Zbog specifićne ciklične strukture boćnog lanca prolina koja ogranićava rotaciju izmeću N i C veze, prolin često zauzima mesta na kojima se aminokiselinski lanac savija. Stoga bi zamena prolina serinom mogla uticati na naćin savijanja proteinskog lanca i potencijalno izazvati promene u njegovoj strukturi.
2. Nesinonimna mutacija u okviru 505-4R gena A38237G koja rezultira promenom u Asp252Glu u kodirajućem delu genoma. Asparagin je kisela aminokiselina sa negativno naelektrisanim boćnim lancem, dok je glicin nepolarna aminokiselina bez naelektrisanja. Ova promena može uticati na ukupno naelektrisanje proteina i mogla bi da utiće na interakcije proteina s drugim proteinima ili sa ligandima.
3. Nesinonimna mutacija u okviru gena MGF 505-9R A43875G koja rezultira promenom Ile58Val u kodirajućem delu genoma. Iako su izoleucin i valin hidrofobne aminokiseline koje se obićno nalaze u unutrašnjosti proteina, izoleucin poseduje neznatno veći boćni lanac. Ova zamena može prouzrokovati blagu promenu u lokalnom prostornom rasporedu molekula.
4. Sinonimna mutacija u okviru NP1450L gena i to G133527A koja ne dovodi do promene u aminokiselinskom nizu.
5. Nesinonimna mutacija u okviru I215L gena T174906C koja rezultira promenom u Glu80Gly u kodirajućem delu gena. Promena glutamina u glicin može rezultirati

promenom u naelektrisanju aminokiselinskog lanca s obzirom da je glutamin polarna nenaelektrisana aminokiselina, a glicin nepolarna alifatična aminokiselina.

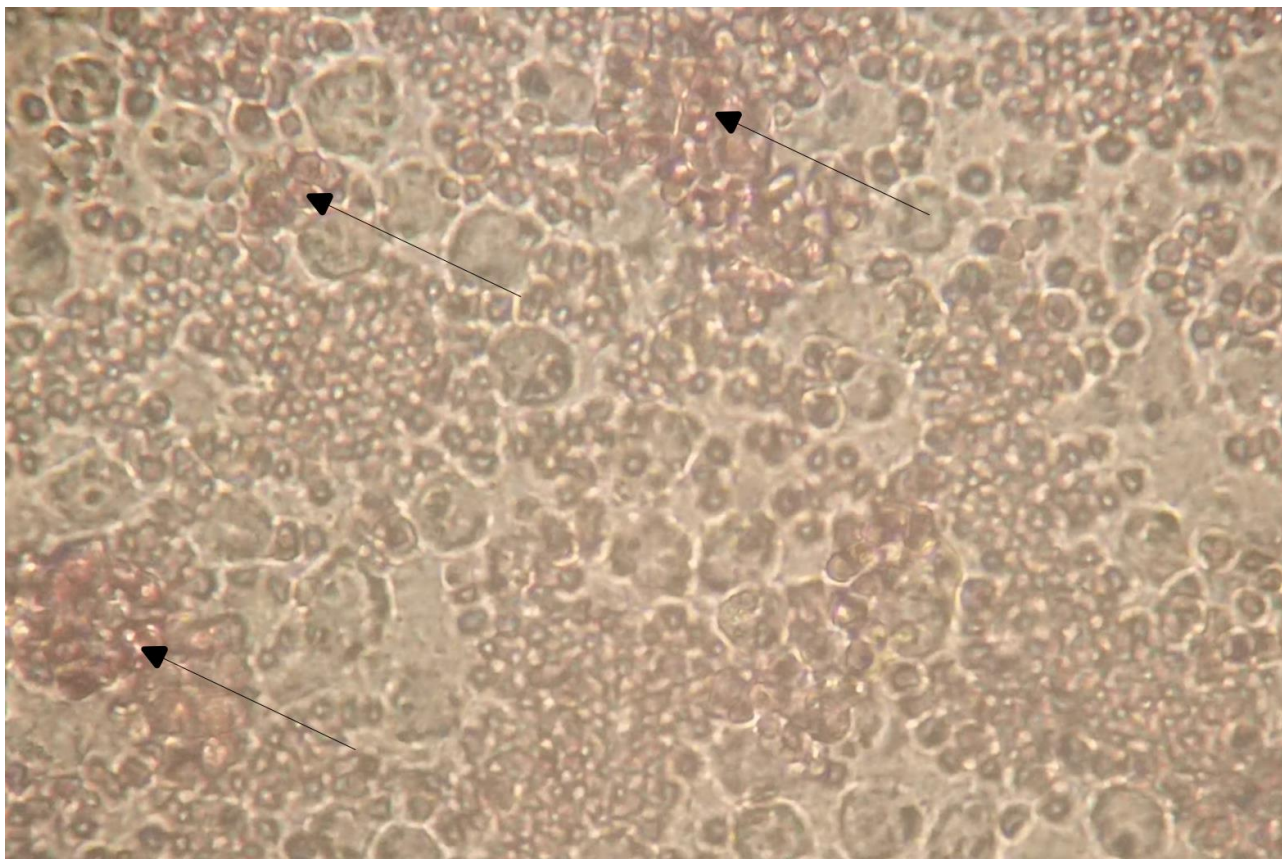
Tabela 17. Distance sekvenci celih genoma korišćenih u filogenetskoj analizi.

	LR722599	NC044959	ON108571	OR660695	OR660696	OR660698	OR660699	OR660697	MK543947	OM966720	MT847622	LR899193
LR722599		99.99	99.98	99.75	99.80	99.99	99.80	99.85	99.49	99.99	99.99	99.98
NC044959	99.99		99.98	99.75	99.79	99.98	99.80	99.84	99.48	99.98	99.98	99.97
ON108571	99.98	99.98		99.74	99.79	99.98	99.80	99.84	99.48	99.98	99.97	99.97
OR660695	99.75	99.75	99.74		99.94	99.94	99.94	99.61	99.61	99.93	99.93	99.74
OR660696	99.80	99.79	99.79	99.94		99.99	99.98	99.66	99.66	99.98	99.97	99.78
OR660698	99.99	99.98	99.98	99.94	99.99		99.99	99.84	99.70	99.98	99.98	99.97
OR660699	99.80	99.80	99.80	99.94	99.98	99.99		99.66	99.66	99.98	99.98	99.78
OR660697	99.85	99.84	99.84	99.61	99.66	99.84	99.66		99.34	99.85	99.84	99.85
MK543947	99.49	99.48	99.48	99.61	99.66	99.70	99.66	99.34		99.99	99.98	99.47
OM966720	99.99	99.98	99.98	99.93	99.98	99.98	99.98	99.85	99.99		99.99	99.98
MT847622	99.99	99.98	99.97	99.93	99.97	99.98	99.98	99.84	99.98	99.99		99.99
LR899193	99.98	99.97	99.97	99.74	99.78	99.97	99.78	99.85	99.47	99.98	99.99	

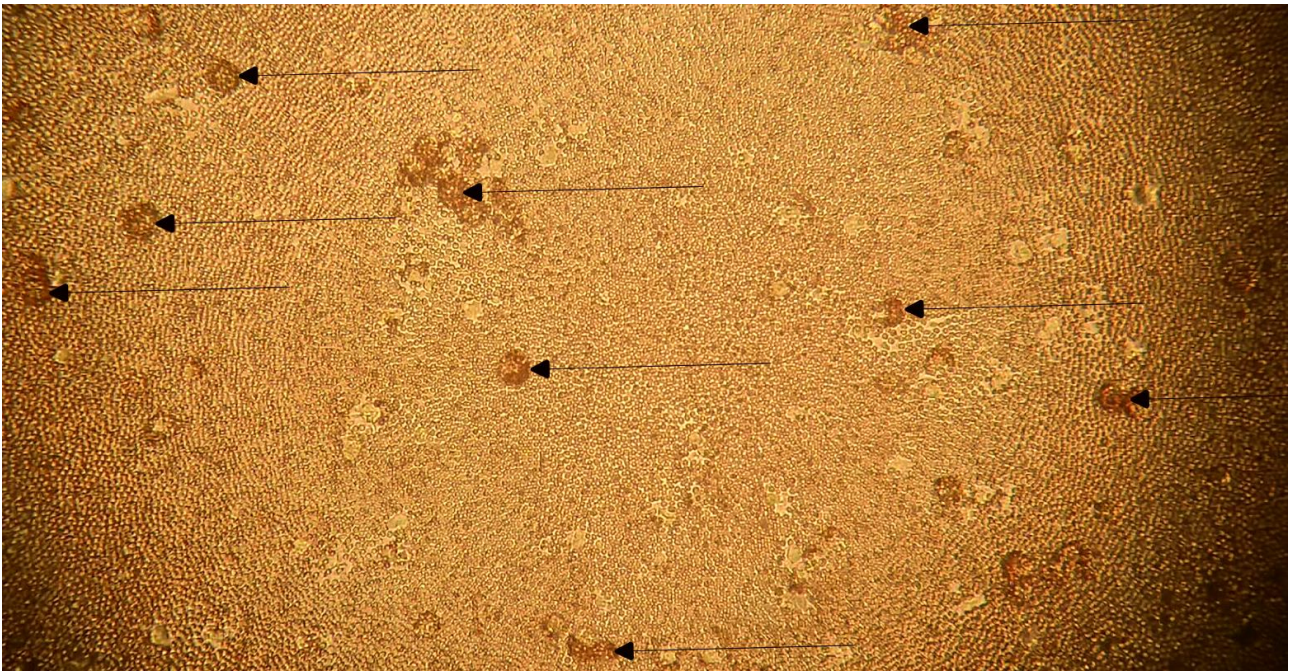
Na tabeli 17. su prikazane distance celih genoma korišćenih u filogenetskoj analizi. Oznake uzoraka se nalaze u prvom redu i prvoj koloni. Svaki uzorak je označen drugom bojom. Vrednosti su označene brojevima od 0 do 100. Što je vrednost viša, sličnost između sojeva je viša.

REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA AKS NA PRIMARNOJ KULTURI TKIVA POREKLOM OD ALVEOLARNIH MAKROFAGA

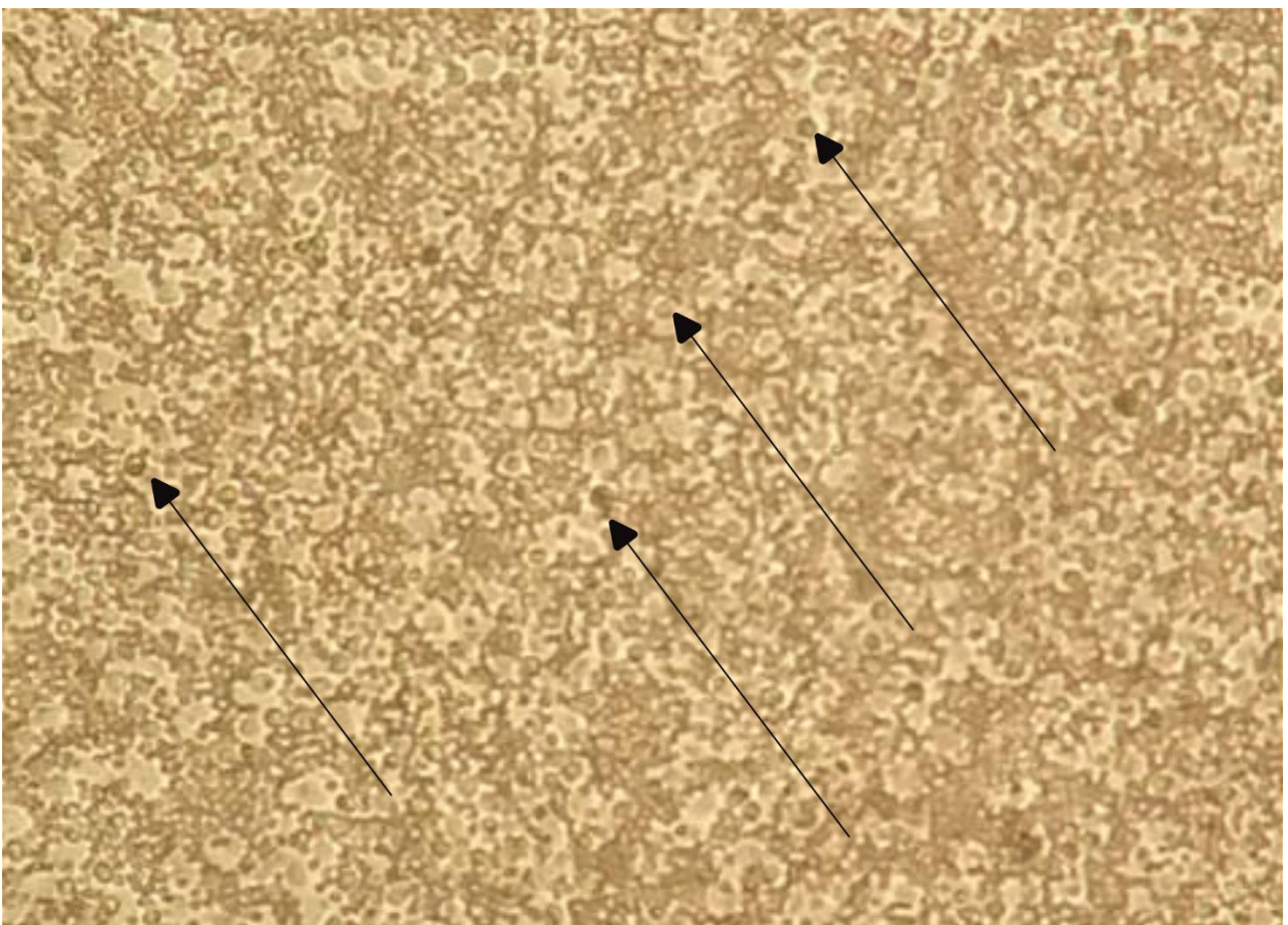
Od 22 inokulisana uzorka virusa AKS, u prvih 24 sata izolovano je 10 uzoraka (45,5 %) sa efektom hemadsorpcije (Slika 9-11). Nakon 48 sati, broj izolovanih uzoraka povećao se na 12 (54,5 %). Nakon 72 sata i druge pasaže, ukupno je izolovano 16 uzoraka (72,7 %).



Slika 9. Uveličanje 400x. Crnim strelicama su obeležene nakupine eritrocita na inficiranim makrofagima 48 h od inokulacije.



Slika 10. Uveličanje 50x. Crnim strelicama su obeležene nakupine eritrocita na inficiranim makrofagima 48h od inokulacije.



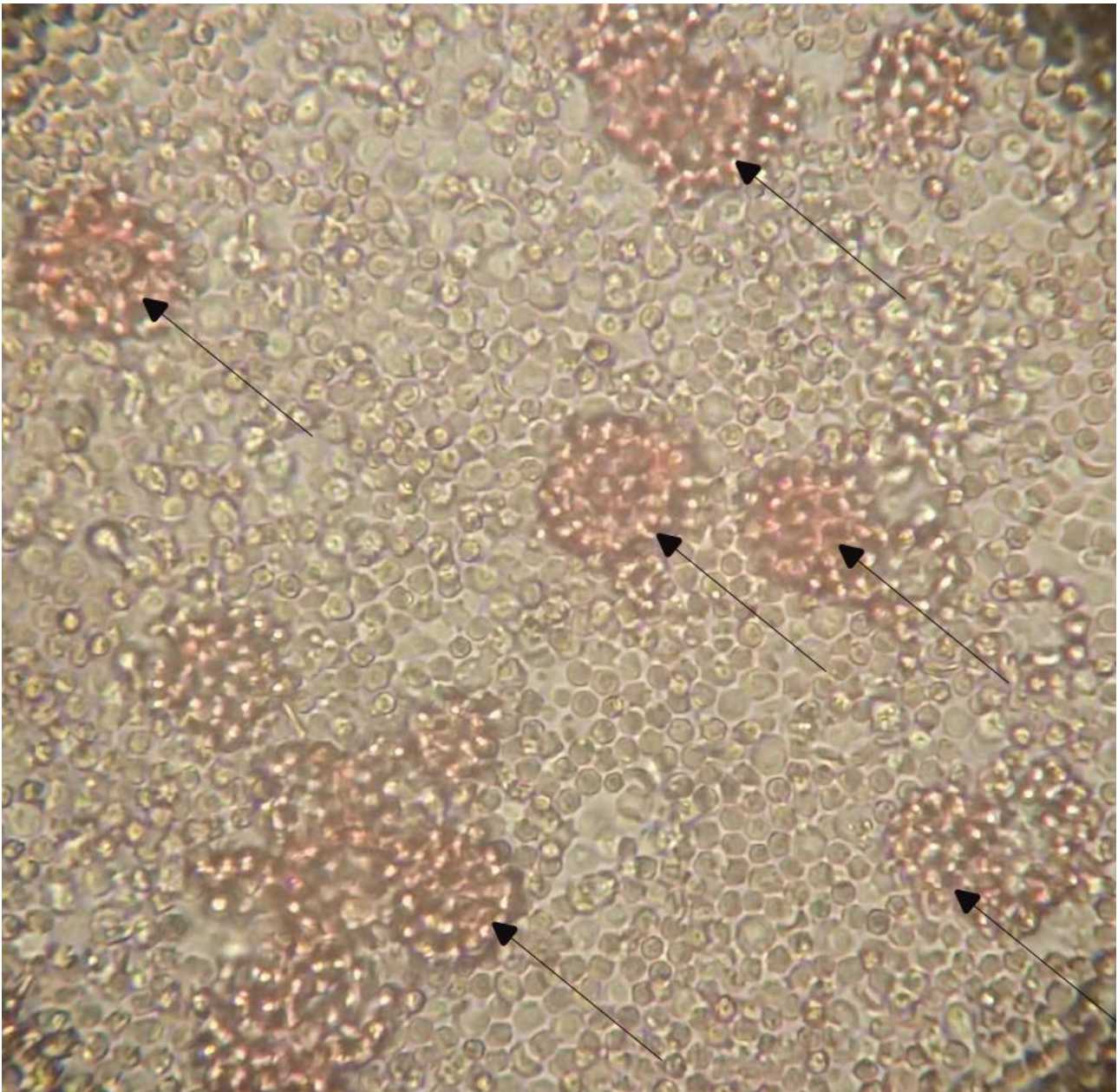
Slika 11. Uveličanje 400x. Negativan nalaz, bez pojave nakupina eritrocita na makrofagima.

REZULTATI IZOLACIJE VIRUSA AKS NA PRIMARNOJ KULTURI TKIVA POREKLOM OD LEUKOCITA

Od 22 inokulisana uzorka, virus AKS je uspešno izolovan kod 20 uzoraka (91,3 %) sa efektom hemadsorpcije (označeno crnom strelicom) (slika 13-14). Prisustvo virusa je zabeleženo u 15 uzoraka (68,2 %) 24 sata nakon inokulacije. Nakon 48 sati, broj pozitivnih uzoraka je 18 (81,8 %). Konačan broj od 20 pozitivnih uzoraka (91,3 %) postignut je nakon 72 sata (slika 12-13).



Slika 12. Uveličanje 50x. Crnim strelicama su obeležene nakupine eritrocita na inficiranim leukocitima 48h od inokulacije.



Slika 13. Uveličanje 400x. Crnim strelicama su obeležene nakupine eritrocita na inficiranim leukocitima 48 h od inokulacije.

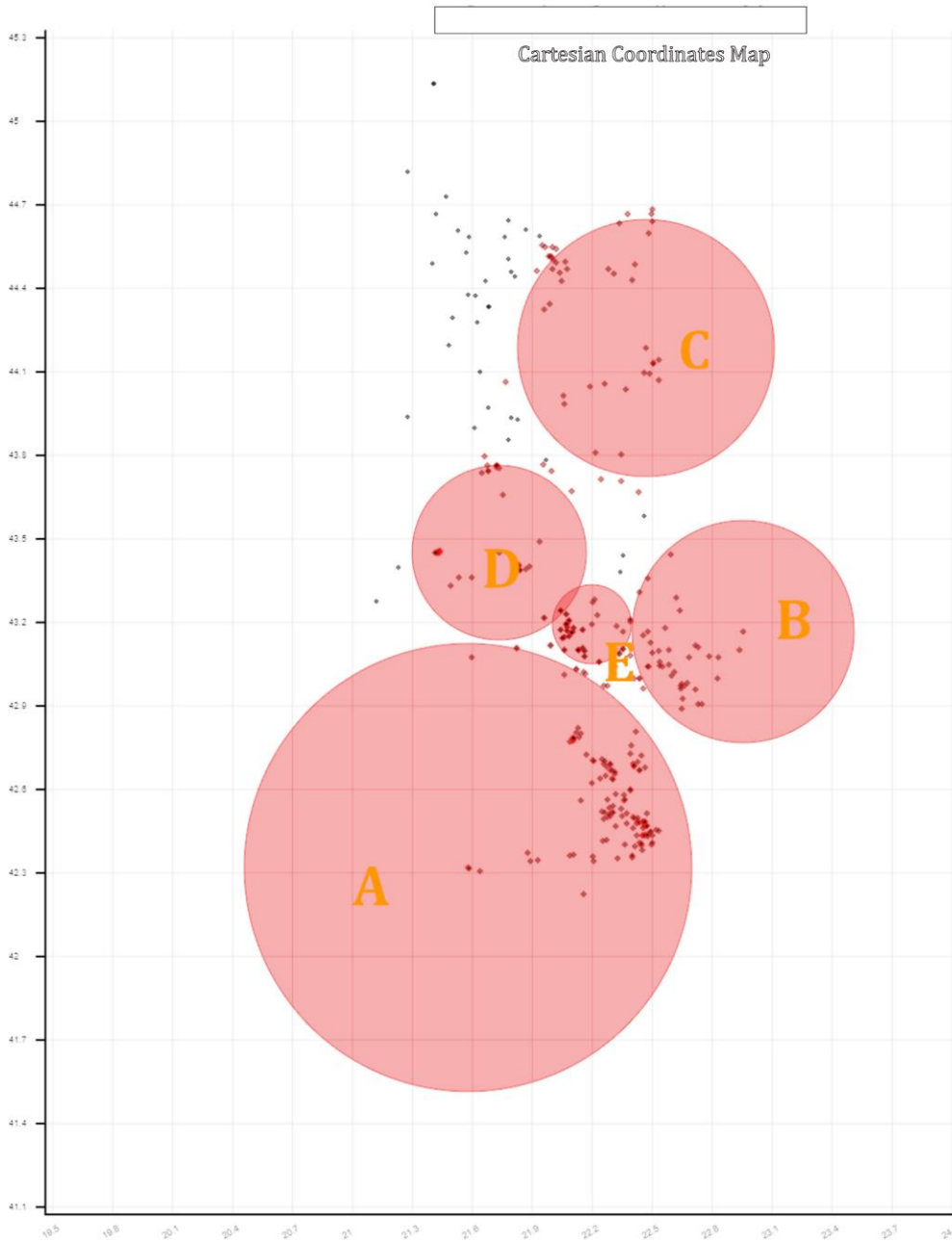
PROSTORNO VREMENSKA ANALIZA POZITIVNIH UZORAKA POREKLOM OD DIVLJIH SVINJA OD 2020. DO 2023. GODINE

Prostorno-vremenskom analizom pojave AKS, ustanovljeno je postojanje pet klastera (Tabela 18.). Distribucija klastera u koordinatnom sistemu geografske širine i dužine teritorije Srbije je prikazana na Slici 14. Na Mapi 2. je prikazana prostorno-vremenska distribucija žarišta AKS kod divljih svinja od 2020. do 2023. godine.

Tabela 18. Klaster A-E, vrednosti zabeležene tokom prostorno vremenske analize.

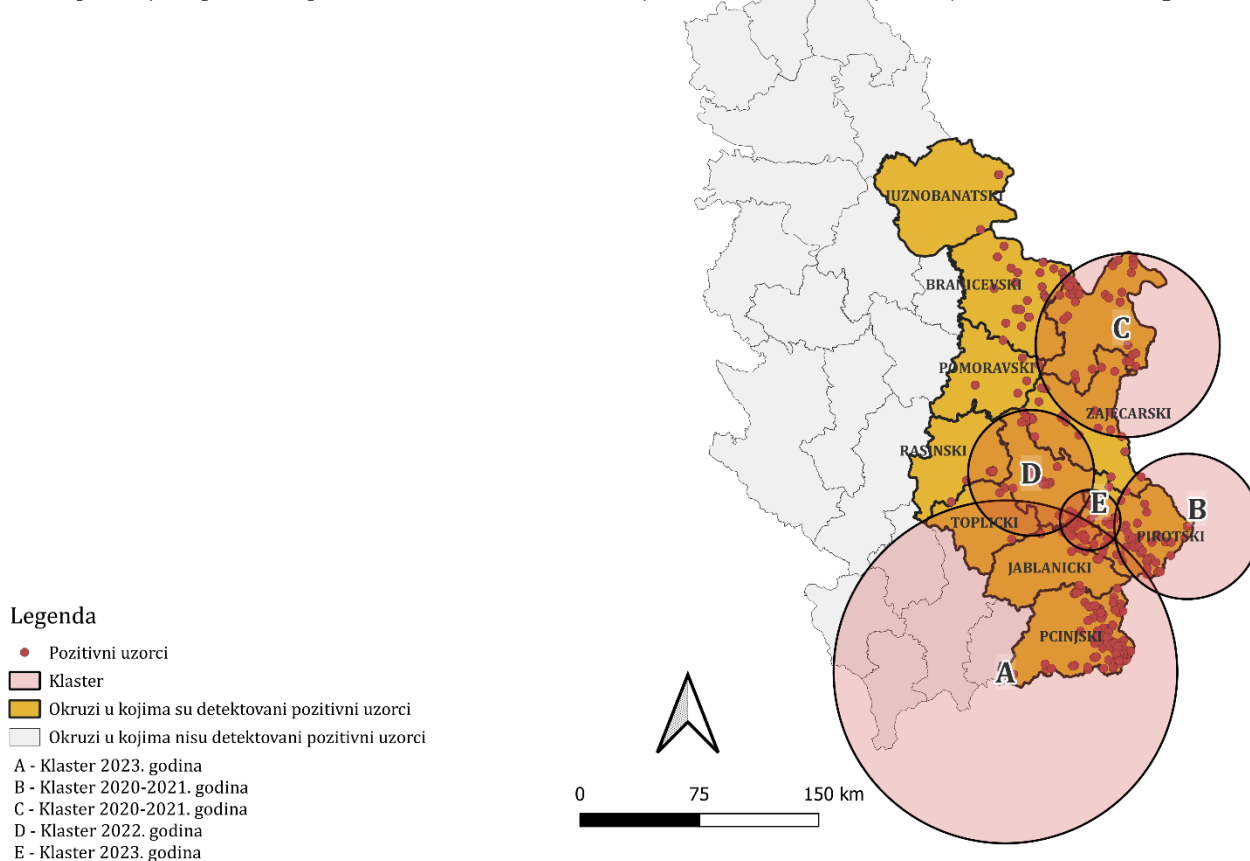
Klaster A	
Koordinate i prečnik:	(42.320307 N, 21.577248 E)/107.90 km ²
Vremenski okvir:	2023/1/1 to 2023/12/31
Broj slučajeva	172
Očekivani broj slučajeva	97.19
Stvarni/očekivani broj slučajeva	1.77
Statistika testa	33.374910
p-vrednost	< 0.000000000000000001
Klaster B	
Koordinate i prečnik:	(43.451200 N, 21.732300 E)/39.54 km ²
Vremenski okvir:	2022/1/1 to 2022/12/31
Broj slučajeva	57
Očekivani broj slučajeva	16.41
Stvarni/očekivani broj slučajeva	3.47
Statistika testa	32.582448
p-vrednost	< 0.000000000000000001
Klaster C	
Koordinate i prečnik:	(43.165546 N, 22.952582 E)/45.76 km ²
Vremenski okvir:	2022/1/1 to 2022/12/31
Broj slučajeva	39
Očekivani broj slučajeva	11.66
Stvarni/očekivani broj slučajeva	3.34
Statistika testa	20.720462
p-vrednost	< 0.0000000001
Klaster D	
Koordinate i prečnik:	(44.186810 N, 22.466075 E)/57.83 km ²
Vremenski okvir:	2020/1/1 to 2021/12/31
Broj slučajeva	42
Očekivani broj slučajeva	13.30
Stvarni/očekivani broj slučajeva	3.16
Statistika testa	20.690327
p-vrednost	0.0000000011

Klaster E	
Koordinate i prečnik:	(43.192492 N, 22.199736 E)/19.05 km ²
Vremenski okvir:	2023/1/1 to 2023/12/31
Broj slučajeva	39
Očekivani broj slučajeva	24.80
Stvarni/očekivani broj slučajeva	1.57
Statistika testa	3.723559
p-vrednost	0.004



Slika 14. Distribucija klastera geografske širine i dužine teritorije Srbije prikazana u koordinatnom sistemu. Na X osi je prikazana geografska dužina, a na Y osi geografska dužina. Na mapi su krugovima obeleženi klasteri pozitivnih divljih svinja obeleženih slovima A-E.

Mapa Srbije sa prikazom prostorno-vremenske distribucije žarišta AKS kod divljih svinja od 2020 do 2023. godine.



Mapa 2. Mapa Srbije sa prikazom prostorno-vremenskom distribucijom žarišta AKS kod divljih svinja od 2020. do 2023. godine.

DISKUSIJA

EPIZOOTIOLOŠKA ANALIZA AKS

Od pojave u Gruziji 2007. godine, AKS se širila preko Kavkaza ka Rusiji i potom zapadno prema Evropi. Od tada je zabeležena pojava AKS u mnogim evropskim zemljama uključujući Jermeniju, Azerbejdžan, Rusiju, Ukrajinu, Moldaviju, Belorusiju, Poljsku, Rumuniju, Slovačku, Nemačku, Grčku, Mađarsku, Italiju, Belgiju, Bugarsku, Republika Češku, Estoniju, Letoniju, Litvaniju, Srbiju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru i Severnu Makedoniju (Rowlands i sar. 2008; Ojševskis i sar. 2016; Koeltz i sar. 2018; Sargsyan i sar. 2018; Milićević i sar. 2019; Sauter-Louis i sar. 2021b; Woźniakowski i sar. 2021; Jo i Gortázar 2021; Iscaro i sar. 2022; Gallardo i sar. 2023; Ladoši i sar. 2023, European Comission (ADIS) 2024). Belgija i Češka - su uspele da iskorene AKS kod divljih svinja, s tim da se bolest ponovo pojavila u Češkoj kao rezultat novog unosa virusa (WOAH 2022).

Virus AKS je prvi put identifikovan u Srbiji 28. jula 2019. godine u selu Rabrovac-Šume koje pripada opštini Mladenovac. Inicijalno žarište virusa je uspešno suzbijeno zahvaljujući brzom reakciji i primeni hitne depopulacije svinja u primarnom žarištu. Imajući u vidu udaljenost najbližeg žarišta, kao i rezultate epizootioloških anketa, pretpostavljeno je da je virus unet antropogenim aktivnostima (Milićević i sar. 2019). Drugi slučaj AKS u Srbiji je zabeležen iste godine u blizini granice sa Rumunijom, u selu Srpski Itebej, takođe, kod domaćih svinja. Nakon hitne depopulacije svinja u zahvaćenom području, nova žarišta nisu zabeležena do kraja 2019. godine.

Prvim slučajevima kod divljih svinja u Srbiji koji su se pojavili već u januaru 2020. godine, doprinela je migracija divljih svinja iz zaraženih područja u okolnim zemljama. Tokom te godine zabeležena su 63 žarišta kod divljih svinja u jugoistočnom delu Srbije (u Pirotskom, Zaječarskom i Borskom okrugu). U 2021. godini broj žarišta kod divljih svinja se povećao na 73, takođe, na području jugoistočne Srbije. Prostorno-vremenskom analizom identifikovana su dva klastera: klaster B sa centrom u Pirotskom okrugu i klaster C koji obuhvata slučajeve iz Zaječarskog, Borskog i Braničevskog okruga. Klaster B obuhvata površinu od 39,54 km², dok klaster C pokriva 65,76 km², pri čemu je statistička značajnost oba klastera ispod 0,05, što ih čini statistički značajnim. Klasteri se definišu kao visoka učestalost slučajeva bolesti u određenom regionu čija je verovatnoća slučajnog nastanka mala. U 2022. godini identifikovan je klaster D koji se nalazi zapadnije, u Nišavskom okrugu veličine 57,83 km². Iste godine zabeleženi su i prvi slučajevi zaraze kod domaćih svinja u Pomoravskom okrugu koji su van klastera D, te se pretpostavlja da su ti slučajevi rezultat antropogenog širenja zaraze (Glišić i sar. 2023). Broj slučajeva bolesti dostigao je maksimum u 2023. godini kada je registrovano 198 žarišta kod divljih svinja do 14. novembra 2023. godine. Prostorno-vremenskom analizom su utvrđena dva klastera na jugu zemlje. Klaster A, koji se prostire na površini od 107,9 km², obuhvata teritorije pet okruga: Pčinjski, Pirotski, Jablanički, Toplički i Nišavski. Pored toga, postoji i klaster E koji zauzima manju površinu od 19,05 km², ali se ističe većom koncentracijom slučajeva, posebno u Nišavskom, Pirotskom i Jablaničkom okrugu. Zaražene divlje svinje se smatraju ključnim faktorom u održavanju virusa u prirodi. Međutim, za prenošenje bolesti na domaće svinje uglavnom je odgovoran čovek direktnim ili indirektnim delovanjem. Značajan problem predstavlja veliki broj malih gazdinstava na kojima se uzgaja od 3 do 10 svinja koje čine 39,6 % ukupnog broja registrovanih gazdinstava u Srbiji.

Procena prevalencije bolesti kod divljih svinja zavisi primarno od pasivnog nadzora koji se temelji na prijavljivanju uginulih divljih svinja. Navedeni prisutup zahteva aktivan angažman lovaca i šumara u prijavljivanju i traženju leševa u lovištima. Vergne i sar. (2016) anketirali su lovce iz Bugarske, Rusije i Nemačke u vezi sa prijavljivanjem pronađenih leševa divljih životinja u lovištima. Oko 70 % lovaca je navelo da su prijavili leš u lovištu, dok su oni koji to nisu učinili kao glavni razlog naveli „neinformisanost“. Pored toga, autori navode i druge razloge za neprijavlivanje uginuća kao što su zatvaranje lovišta zbog izbijanja zaraze i gubitak potencijalnog profita.

Slično, Costard i sar. (2015) su pokazali da su mali proizvođači, uprkos edukaciji, često nevoljni da prijave pojavu zaraze. Ovo ne samo da otežava postavljanje pravovremene dijagnoze, već i doprinosi širenju virusa. Uginule domaće svinje koje nisu prijavljene često se odlažu na deponijama, pored i u vodenim tokovima ili šumama što ih čini potencijalnim izvorima infekcije za divlje svinje. U nekim područjima se praktikuje i slobodan uzgoj svinja, gde se životinje držane na otvorenom, slabo ograđenom ili neograđenom prostoru, što im omogućava kontakt sa divljim svinjama i povećava rizik od širenja zaraze. I pored zakonske zabrane hranjenja svinja pomijama, ova praksa se ne može potpuno isključiti kao mogući put širenja infekcije. Dodatno, veterinarski radnici, takođe, mogu širiti bolest jatrogenim putem.

Svi ovi faktori doveli su do razvoja najveće epizootije AKS do sada u Srbiji koja je zabeležena u 2023. godini.

S obzirom na to da virus cirkuliše kod divljih svinja skoro četiri godine očekuje se pojava preživelih divljih svinja i nastanak sojeva srednje virulencije. Gervasi i Guberti (2021) su opisali razvoj epizootije u populaciji divljih svinja kroz četiri faze. Prva faza, koja traje između jedne i dve godine, predstavlja period kada je mogućnost suzbijanja zaraze najveća. Druga faza, koja traje naredne tri do četiri godine, se karakteriše najbržim širenjem zaraze i postepenom prelasku u enzootiju. Treća faza, koja traje narednih pet do sedam godina, predstavlja enzootsku fazu bolesti nakon koje sledi četvrta faza odnosno novi talas epizootije. Ako se uzme u obzir ovaj model širenja, AKS u Srbiji je trenutno u drugoj fazi i može se očekivati da prevalencija dostigne 3 %. Pretpostavlja se da će prevalencija opadati u budućnosti usled smanjenja broja divljih svinja.

KLASIFIKACIJA SOJEVA NA OSNOVU ANALIZE GENSKIH MARKERA

Različiti regioni virusa mutiraju različitim brzinama, veličina genoma virusa otežava praćenje takvih mutacija. Prema Bastos i sar. (2003), sekvenciranje C-terminalnog kraja B646L gena koji kodira p72 protein je neophodno za genotipizaciju. Sojevi unutar jednog genotipa su uobičajeno veoma homogeni. Samo se sojevi u pojedinim genotipovima mogu dalje diferencirati u podgenotipove kao što su I (a, b, c, d), V (a, b), X (a, b) i XX (a, b) na osnovu E183L gena koji kodira p54 protein (Gallardo i sar. 2009).

Sekvenciranje samo B646L gena i E183L gena nije dovoljno za molekularnu epizootologiju genotipa II virusa AKS-a (Faburay 2022). Veći deo virusnog genoma je konzerviran, sa malo ili nimalo varijacija između sojeva. Stoga su utvrđeni varijabilni delovi genoma, tzv. molekularni markeri čijim se sekvenciranjem omogućava praćenje evolucije virusa. U nedavno objavljenim studijama opisan je metod sekvenciranja šest genskih markera koji omogućava razlikovanje 25 grupa evropskih sojeva virusa AKS (Gallardo i sar. 2023; Mazloum i sar. 2023). Neki od genskih markera su centralni varijabilni region (CVR) B602L gena (Nix i sar. 2006) i intergenska regija (IGR) između I73R i I329L gena na osnovu kojeg se razlikuju četiri varijante virusa (Gallardo i

sar. 2014). Dodatno na osnovu ponavljajućih sekvenci unutar IGR između 9R-10R gena (multigenska familija - MGF505) može se diferencirati osam varijanti virusa, a na osnovu promena u O174L genu moguće je razlikovati dve varijante. Delimično sekvenciranje K145R i I215L gena omogućava diferencijaciju tri varijante na osnovu SNP-a (Mazur-Panasiuk i sar. 2020; Gallardo i sar. 2023; Mazloum i sar. 2023).

Iako sekvenciranje nove generacije (NGS) omogućava sagledavanje promena u celom genomu, ove informacije imaju ograničen epizootiološki značaj (Forth i sar. 2020). Međutim, Forth i sar. (2023) su kombinovanjem NGS i Sanger metoda sekvenciranja uspeali da unaprede epizootiološko praćenje sojeva virusa AKS. Genom AKS karakterišu česte rekombinacije na mestima visoke genske varijabilnosti, kao što su regioni sa ponavljajućim sekvencama (de la Vega i sar. 1994; Bao i sar. 2022). Nasuprot tome, regioni u kojima se nalaze geni kao što su B646L i E183L pokazuju mali stepen varijabilnosti sa veoma retkim mutacijama (Li i sar. 2022). U ovoj studiji, svi testirani uzorci su imali identične B646L i E183L regione kao i referentni soj Georgia 2007/1 (FR682468.2) što je u skladu sa nalazima iz drugih evropskih država (Rowlands i sar. 2008; Gogin i sar. 2013; Ojševskis i sar. 2016; Pikalo i sar. 2020; Sauter-Louis i sar. 2021a).

U ovoj studiji analizirani su ponavljajući delovi u CVR i genima I73R-I329L virusa AKS. CVR je posebno interesantan zbog prisustva tetrapeptidnih motiva, kodova, za aminokiseline na pr. nCADT, nNVDI, nCASM, gde 'n' predstavlja broj puta koliko se tetrapeptidni motiv ponavlja. Ovi umeci i njihov broj ponavljanja razlikuju se među sojevima virusa AKS što obezbeđuje varijabilnost sojeva unutar CVR-a (Nixa i sar. 2006). Ovaj region je korišćen za diferenciranje 31 podgrupe virusa AKS-a na afričkom kontinentu (Gallardo i sar., 2009). Međutim, u okviru evroazijskog genotipa II identifikovane su svega tri varijante CVR-a (Gallardo i sar. 2023). Dodatna diferencijacija unutar genotipa II može se postići analizom jednonukleotidnog polimorfizama unutar CVR-a (SNP - Single-nucleotide polymorphism), a koji su do sada detektovani u sojevima iz Estonije (Vilem i sar. 2020), Poljske, Litvanije (Gallardo i sar. 2023), Kine (Shi i sar. 2022) i Ruske Federacije (Mazloum i sar. 2022). Pojava SNP mutacija unutar CVR-a je sporadična i potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio njihov značaj.

U okviru ovog istraživanja 21,1 % analiziranih sojeva iz Srbije ima sinonimnu mutaciju nukleotida T318A u okviru B602L gena. Iako je ova sinonimna mutacija zabeležena kod divljih i domaćih svinja u uzorcima prikupljenim između 2020. i 2022. godine, nije došlo do geografske grupacije sojeva. Kod dva soja, SRB/2020/7511 i SRB/2021/5431, zabeležene su dve SNP mutacije koje su dovele do aminokiselinske promene. Ove promene pružaju mogućnost za klasifikaciju sojeva unutar prve grupe CVR. Promene su zabeležene kod sojeva detektovanih kod domaćih svinja, pri čemu je soj SRB/2020/7511 identifikovan tokom 2020. godine, a SRB/2021/5431 tokom 2021. godine. Brzo suzbijanje žarišta i neškodljivo uklanjanje obolelih domaćih svinja u tom periodu bi moglo biti objašnjenje za izostanak širenja ovih sojeva. Kod većine analiziranih sojeva (79 %) u našoj studiji nisu utvrđene varijacije u odnosu na referentni soj AKS Georgia 2007/1.

Centralni varijabilni regioni B602L gena i IGR između I73R-I329L gena karakteriše visok stepen polimorfizma unutar konzerviranog centralnog dela genoma virusa AKS (Bao i sar. 2022). Ponavljajuća "TATATAGGAA" sekvenca unutar IGR (Gallardo i sar. 2014), omogućava klasifikaciju genotipa II virusa AKS na osnovu broja ovih segmenata u četiri glavne varijante, IGR I - IGR IV. U okviru analize domaćih sojeva virusa AKS, identifikovana je najčešća varijanta IGR II koja se odlikuje prisustvom tri ponavljajuća segmenta "TATATAGGAA". Ovoj varijanti

pripada 98,6 % sojeva što je u skladu sa nalazima drugih autora (Gallardo i sar. 2014, 2023; Tran i sar. 2021; Nguyen i sar. 2022; Shi i sar. 2022). Varijanta IGR III sa četiri ponavljajuća segmenta je zabeležena po prvi put na teritoriji Srbije. Međutim, varijanta IGR III je ranije identifikovana u Poljskoj u žarištima kod domaćih i divljih svinja kao i u Kini, Vijetnamu i Južnoj Koreji (Mazur-Panasiuk i sar. 2020; Kim i sar. 2021; Tran i sar. 2021; Nguyen i sar. 2022; Shi i sar. 2022). Uprkos postojanju više IGR varijanti u navedenim zemljama, dominantna varijanta je IGR II. Specifične SNP mutacije u IGR regiji predstavljaju jedinstven marker za sojeve prisutne u Srbiji i ukazuju na mogućnost dodatne genske diferencijacije unutar sojeva IGR II. Ovaj nalaz pruža osnovu za detaljniju molekularnu karakterizaciju i razumevanje širenja AKS-a na teritoriji Srbije.

IGR III soj u Srbiji je detektovan u populaciji svinja na području gde ranije nije bilo zabeleženih infekcija. Verovatnoća da je ovaj soj nastao usled pojedinačne, izolovane, mutacije se može smatrati malom. Verovatnije je da je IGR III unet u ovo područje transportom inficiranih životinja ili kontaminiranim proizvodima. Stoga su podizanje biosigurnosnih mera na najviši nivo i kontrola prometa životinja i životinjskih proizvoda mere kojima se može sprečiti unos novih sojeva. Nelegalni promet inficiranih životinja ili kontaminiranih proizvoda preko granica može biti objašnjenje za pojavu novih sojeva AKS-a u novim regionima.

Sangerova metoda sekvenciranja pojedinačnih gena pruža priliku za dobijanje pouzdanih rezultata koji su lakši za analizu i primenu u klasifikaciji različitih sojeva. Međutim, ovaj pristup ne omogućava praćenje promena u drugim strukturnim delovima genoma, kao ni praćenje evolucije virusa.

ANALIZA PROMENA U CELOM GENOMU SOJEVA VIRUSA AKS

Mutacije koje su identifikovane sekvenciranjem celog genoma virusa mogu se kategorisati kao one od velikog i malog značaja. Mutacije velikog značaja obuhvataju one koje mogu doprineti preciznijoj klasifikaciji sojeva AKS ili uticati na funkcionalnost proteina. Uz ove, zapažene su i dodatne mutacije čiji uticaj nije u potpunosti jasan. To su tihe mutacije u genima čija funkcija nije do kraja objašnjena, kao i mutacije u intergenskim regionima koje se odlikuju umetanjem poli-C ili poli-G sekvenci. Savremene generacije aparata za sekvenciranje imaju karakteristiku nepouzdanog očitavanja regiona bogatih G/C parovima što može rezultirati određenim nepreciznostima u konačnim rezultatima sekvenciranja i većim brojem grešaka (Forth i sar., 2023).

U našoj studiji detektovano je 10 mutacija malog značaja (produženi poli C i poli G regioni u okviru MGF grupacije 110 i 360 kao i ACD grupe gena, pojedinačne delecije nekodirajućih delova intergenskih regiona).

Mutacije velikog značaja su:

1. ACD grupa gena

Funkcija velikog broja opisanih (*annotated*, eng.) gena virusa AKS još uvek nije definisana, kao što je slučaj sa ACD 00xx0 grupom gena. Ova grupacija gena je opisana i kod referentnog Georgia 2007/1 soja, s tim da funkcija ove grupacije gena i dalje nije poznata iako se nalaze na različitim mestima u genomu (Olesen i sar. 2021). Autori Forth i sar. (2023) su opisali mutacije velikog značaja (*high impact HI*, eng.) u ACD 00190 genu koje su dovele do skraćanja "potencijalnog" proteina (*truncation*, eng.) i koje mogu

služiti kao markeri za praćenje različitih sojeva. U okviru gena ACD00190 kod sojeva SRB 6511/21 i SRB 6314/19 identifikovane su četiri nesinonimne mutacije: T12577A, A12578T, G12580A i A12581G. Ove mutacije su dovele do promene u aminokiselinskom nizu zamenom tirozina izoleucinom na šestoj poziciji (Tir6Ile) i serina leucinom na petoj poziciji (Ser5Leu) u kodirajućem delu gena ACD00190. Tirozin i serin su polarne aminokiseline, dok su izoleucin i leucin nepolarne. Ova promena može uticati na tercijarnu strukturu. U zavisnosti od funkcije kao i od položaja u trodimenzionalnoj strukturi proteina, promene se mogu odraziti na imunogenost, promene signalnih puteva ili jednostavno funkciju samog proteina.

Druga mutacija zabeležena u okviru ACD 00xx0 grupe gena je opisana kod sojeva SRB 167/20, SRB 6314/19, SRB 6511/21 i SRB 7540/22. U okviru gena ACD 00210 kod sva četiri soja zabeležena je nesinonimna mutacija C13596T koja je dovela do zamene serina prolinom na 43. mestu (Ser43Pro) unutar kodirajućeg regiona gena ACD00210. Zamena serina prolinom u aminokiselinskom lancu ne menja električni naboj proteina jer su obe aminokiseline neutralne. Međutim, ova promena može uticati na sposobnost proteina da uspostavlja vodonične veze i na njegovu hidrofilnost, zbog čega može doći do promene u njegovoj strukturi ili načinu interakcije sa drugim molekulima. Serin sadrži hidroksilnu grupu koja omogućava formiranje vodoničnih veza, dok prolin ima strukturu prstena koja može izazvati rigidnost u proteinskom lancu. Ova izmena može imati značajne posledice na funkciju proteina, naročito ukoliko se odvija u aktivnom centru ili u delu proteina bitnom za interakciju sa drugim proteinima. Identična promena je zabeležena u sojevima iz 2022. godine u Italiji (ON108571.3), pri čemu ove promene nisu opisane u drugim evropskim i azijskim sojevima (Giammarioli i sar. 2023).

2. NP1450L

Virion virusa AKS poseduje alfa-amanitin rezistentnu DNK-zavisnu RNK polimerazu. Salas i sar. (1986) su pokazali da virus AKS može da se replikuje bez obzira na prisustvo inhibitora ćelijske DNK polimeraze što je dovelo do otkrića da virus kodira sopstvenu DNK-zavisnu RNK polimerazu. Yáñez i sar. (1993) su poređenjem sekvenci gena NP1450L i EP1242L virusa AKS sa sekvencama RNK polimeraza eukariotskih ćelija, kao što su kvasci i *Escherichia coli* otkrili da dve najveće subjediniće DNK-zavisne RNK polimeraze virusa AKS imaju visok stepen homologije sa RNK polimerazama eukariota, što ukazuje na izuzetnu evolutivnu konzerviranost ovih enzimskih sistema. Slične karakteristike DNK-zavisne RNK polimeraze poseduju i virusi iz grupe NCLDV, s tim da i kod njih kao i kod virusa AKS nedostaje ponovljivi C-terminalni domen koji je prisutan kod eukariota. Kod 4 od 5 sekvenciranih sojeva iz Srbije detektovana je sinonimna mutacija G133527A u genu NP1450L. Smatra se da ovaj segment ima ključnu ulogu u transkripciji strukturnih proteina (Rodríguez and Salas 2013). Uprkos tome što ustanovljene nukleotidne promene ne indukuju i promene u aminokiselinskom sastavu, neophodno je kontinuirano praćenje ovog regiona zbog potencijala za razvoj značajnijih mutacija koje bi mogle uticati na ekspresiju virusa i njegovu virulentnost. Zabeležena mutacija je prvi put detektovana kod sojeva iz Srbije i mogla bi predstavljati jedinstveni genski marker za dalje praćenje i evoluciju sojeva bez obzira što se radi o tihoj mutaciji.

3. ECO2

Gallardo i sar. (2023) su uspostavili unapređeni sistem klasifikacije koji omogućava precizniju diferencijaciju visoko-srodnih sojeva virusa AKS. Ovaj sistem podrazumeva praćenje pojave SNP u okviru ECO2 regiona koji predstavlja C-terminalni deo I215L gena. Na ovaj način su identifikovane dve genomske grupe virusa u Evropi. Pretpostavlja se da se genomska grupa II formirala u Rumuniji tokom 2018. godine, odakle se potom proširila na druge delove jugoistočne Evrope, uključujući Srbiju, Bugarsku, Severnu Makedoniju i Grčku. Ovu grupu karakteriše nesinonimna mutacija T174906C u okviru I215L gena koja rezultira promenom u Glu80Gly u kodirajućem delu gena. U okviru naših ispitivanja, sojevi virusa AKS iz 2019. godine upravo poseduju ovu mutaciju uključujući i soj SRB 6314/19 koji je doveo do prvog izbijanja bolesti u Srbiji 2019. godine. Sojevi iz narednih godina, SRB 167/20, SRB 6511/21 i SRB 7540/22, takođe, poseduju navedenu mutaciju što ukazuje da dele istog evolutivnog pretka. Sa druge strane, soj SRB 6759/19 koji je doveo do pojave drugog žarista u Srbiji u julu 2019. godine nema navedenu mutaciju i pripada genogrupi I. Ovi rezultati potkrepljuju hipotezu Milićević i sar. iz 2019. godine o dva nezavisna unosa virusa AKS iz dva različita izvora jer je pokazano da virusi pripadaju različitim genogrupama. Takođe, ovi nalazi ističu važnost ECO2 genskog markera za detaljniju filogenetsku diferencijaciju blisko povezanih sojeva virusa AKS. Pored značaja za klasifikaciju sojeva, sam gen I215L je vrlo značajan za replikaciju virusa (Freitas i sar. 2018). Pretpostavlja se da pI215L ima ulogu u preuzimanju ćelijskog ubikvitin-proteazom sistema, time regulišući funkciju i lokalizaciju kako ćelijskih tako i sopstvenih nosivih proteina. Mutacija T174906C koja dovodi do zamene glutamina glicinom nema važan uticaj na virulentnost virusa. Dokaz o postojanju ECO2 genogrupe I samo kod soja SRB 6759/19, izolovanom u Srpskom Itebeju, ukazuje na mogućnost da na teritoriji Srbije kruži više ECO2 genogrupa, imajući u vidu geografski položaj zemlje i produženo prisustvo virusa. Korišćenjem ovog genskog markera može se napraviti jasnija determinacija cirkulišućih sojeva.

4. O174L

O174L je gen koji kodira polimerazu β -tipa koja se još naziva i polimeraza X (PolX) (Redrejo-Rodríguez i sar. 2013). Navedena polimeraza ima ulogu u popravci SNP grešaka nastalih u toku replikacije virusa. Posедуje apirimidinsku i apurinsku endonukleaznu aktivnost usled čega joj je funkcija ograničena na detektovanje grešaka u bazama, a ne i delecijama. PolX je veoma slična eukariotskoj Pol β , s tim da je tačnost ugradnje nukleotida od 40 do 700 puta manja (Redrejo-Rodríguez i sar. 2013). Gen za PolX je korišćen za razlikovanje visoko-srodnih sojeva AKS u Poljskoj (Mazur-Panasiuk i sar., 2019) i Nemačkoj (Forth i sar., 2023.). Forth i sar. (2019) su ustanovili da postoji mutacija na 3' kraju PolX gena koja bi mogla dovesti do skraćivanja navedenog gena i do izostanka ili barem smanjenja reparacione sposobnosti polimeraze i samim tim povećanja broja mutacija u genomu. Kod sojeva virusa AKS iz Srbije, mutacija u PolX nije ustanovljena čime se srpski sojevi svrstavaju u liniju I (Cho i sar. 2023). Evolucija gena za PolX ostaje nejasna. Postoji opšteprihvaćena teorija da je PolX gen odgovoran za mutagenozu kao "strateški" enzim koji umnogome doprinosi generisanju novih mutacija (Lamarche i sar. 2006; Forth i sar. 2023). Povećana mutagenost sojeva iz Nemačke se dovodi u vezu sa skraćivanjem gena O174L, a smatra se da ova mutacija značajno doprinosi brzom formiranju novih sojeva. Budući da su sojevi sa ovom mutacijom

identifikovani još 2019. godine u Poljskoj i Rumuniji (Cho i sar. 2023), ne može se sa sigurnošću tvrditi da ova linija nije prisutna u Srbiji.

5. K145R

K145R gen se transkribuje u velikoj količini u kasnoj fazi replikacije virusa. Protein koji nastaje ima veoma konzerviran aminokiselinski sastav kod različitih genotipova virusa. Protein se može detektovati u velikim količinama u citoplazmi inficirane ćelije, ali ga nije moguće dokazati u virionima. Pretpostavlja se da ima ulogu u inhibiciji stresom indukovane apoptoze (Rathakrishnan i sar. 2021). Iako se radi o konzerviranom delu genoma, mutacije u vidu SNP se mogu detektovati i koristiti za klasifikaciju srodnih sojeva virusa. Inicijalno je ovaj genski marker korišćen za klasifikaciju sojeva u zapadnom delu Poljske. Mazur-Panasiuk i sar. 2020 su na osnovu promena SNP-a uspeli da identifikuju zasebne klastere i da zajedno sa drugim genskim markerima retrospektivno utvrde način širenja bolesti. Do sada su detektovane četiri linije virusa AKS na osnovu analize K145R gena. Četiri linije su detektovane u Rusiji, dve u Poljskoj i Rumuniji i dve u Srbiji. Soj SRB 167/20 poseduje nesinonimnu mutaciju u okviru K145R gena i to A66065G koja je dovela do promene u aminokiselinskom nizu i to Ile157Met što je, po našim saznanjima, prvi nalaz ovakve promene. Metionin i izoleucin imaju različite fizičko-hemijske osobine. Izoleucin je nepolarna aminokiselina, dok je metionin polarna. Ovo može uticati na savijanje proteina i njegovu trodimenzionalnu strukturu, što može uticati na njegovu stabilnost ili interakciju sa drugim molekulima. Kod ostalih sojeva promena u K145R genu nije detektovana i svrstavaju se u liniju 1 predstavljenu referentnim sojem Georgia 2007/1.

6. L60L

Delecija L60L gena je zabeležena kod soja SRB 167/20. Navedeni gen je slabo izučavan, ali se pretpostavlja da ima ulogu u replikaciji virusa. Pored toga smatra se da ima uticaj na virulentnost virusa. Da bi izučavali ovaj gen, Yang i sar. (2023) su napravili mutirani soj delecijom samog L60L gena. Nakon intramuskularne inokulacije svinja došlo je uginuća 60 % svinja, dok su preživjele jedinke stekle imunitet protiv identičnog soja (Yang i sar. 2023). Imajući u vidu da je soj SRB 167/20 poreklom od domaće svinje, mogućnost procene preživljavanja nije bila moguća jer su životinje eutanazirane. L60L do sada nije korišćen kao genski marker, ali s obzirom na rezultate ispitivanja Yang i sar. (2023) trebalo bi razmotriti njegovu primenu. Efekat koji bi specifična delecija mogla imati na dalju transmisiju virusa AKS ostaje nejasan. Prirodni mutanti sa delecijom L60L gena su do sada detektovani samo u Estoniji (Zani i sar. 2018). Da bi se utvrdila prevalencija ove mutacije, potrebno je sprovesti retrospektivnu analizu uzoraka prikupljenih sa iste geografske lokacije. Postoji verovatnoća da se radi o izolovanom incidentu spontane prirode koji se nije dalje proširio. Dodatno, iako postoji minimalna šansa, ne može se isključiti mogućnost greške u procesu sekvenciranja zbog lošeg kvaliteta nukleinske kiseline u tom regionu genoma.

7. MGF

MGF predstavlja grupu gena 110, 360 i 505. Ove grupe gena karakterišu ponavljajući segmenti što objašnjava značajne varijacije u veličini genoma među različitim sojevima. U okviru genske grupe 505, geni označeni kao 9R i 10R sadrže ponavljajuće sekvence AGTAGTTCAGTTAAGAT u neposrednoj blizini 5' kraja gena 9R, kao i segment

AGTTCATTTAAGTCAAT koji se ponavlja. Broj ponovljenih segmenata omogućava diferencijaciju osam grupa virusa (Gallardo i sar. 2023). Većina sojeva može se klasifikovati kao pripadnici grupe I, u kojoj se nalazi i referentni soj Georgia 2007/1, karakterističan po tome što se određeni segmenti u njemu ponavljaju jedanaest puta. Svi sojevi iz ove studije pripadaju upravo grupi I koja predstavlja najzastupljeniju grupu u Evropi. Uzimajući u obzir da je u Rumuniji identifikovana i šesta grupa sojeva, ne može se isključiti verovatnoća da u Srbiji kruže različiti sojevi virusa klasifikovani na osnovu ovih genskih markera.

Ukupna sličnost sojeva iz ove studije na osnovu nukleotidnih sekvenci celih genoma je vrlo visoka, između 99,7 % i 99,9 %. Najveću sličnost sa referentnim sojem čak 99,9 % pokazuje soj SRB 6759/19 kod koga je ujedno zabeležen i najmanji broj mutacija. Mutacije koje su zabeležene kod navedenog soja nisu zabeležene kod ostalih, što sugeriše da ovaj soj pripada drugog genskoj liniji. Filogenetskom analizom je moguće identifikovati tri različite grupe virusa. U prvoj podgrupi nalaze se sojevi iz Gruzije (NC044959), Italije (ON108571) i Moldavije (LR722599), dok drugu podgrupu čine sojevi Poljske (MT847622, MT847622) i Nemačke (LR899193). Treću podgrupu formiraju sojevi iz ove studije, zajedno sa sojem MK543947 iz Belgije. S obzirom na to da svi sojevi pripadaju genotipu II, da su vrlo slični kao i da je genom virusa veoma dugačak, detektovane promene se mogu smatrati minornim. Stoga je teško izvršiti preciznu filogenetsku analizu kao i obračunati stopu mutacije. Zbog velike sličnosti sojeva, izbor "out of group" sekvence je teško jer se usled sličnosti svi sojevi klasifikuju kao jedna grupa. Sekvenciranje i analiza celih genoma virusa je izuzetno zahtevna i često neefikasna, s obzirom na obimnost informacija koje je potrebno analizirati i ograničen obim relevantnih podataka koji su na kraju upotrebljivi. Primena ove metodologije je tehnički kompleksna i finansijski zahtevna za svakodnevnu upotrebu, zbog čega se preporučuje korišćenje pristupa zasnovanog na analizi više gena i glavnih genskih markera bitnih za klasifikaciju sojeva. Ovaj pristup omogućava precizno određivanje virusnih linija i omogućava molekularno-epizootiološke analize. Analiza celih genoma ima veliki značaj jer pruža detaljan uvid u strukturu celokupnog genoma. Takva analiza ne samo da omogućava proučavanje različitih gena koji nisu uključeni u diferencijaciju sojeva, već su i ključni za razumevanje virulentnosti virusa. Osim toga, s obzirom na ograničene informacije o mehanizmima i brzini evolucije i mutacija različitih gena, periodično sekvenciranje celih genoma je od izuzetnog značaja jer može otkriti karakteristike do tada neistraženih gena. Uzorci koji su značajni za analizu celog genoma su oni koji predstavljaju prve slučajeve zaraze u područjima gde virus ranije nije bio prisutan, kao i uzorci od svinja kod kojih su zabeležene promene u kliničkim znacima ili toku bolesti. Analiza celih genoma virusa prvih slučajeva u državi ili teritoriji je od izuzetne važnosti, jer omogućava identifikaciju porekla sojeva što je potvrđeno i u ovoj studiji, gde je analizom ECO2 regiona utvrđen unos virusa AKS iz dva odvojena izvora.

Protein CDv2 koji kodira gen EP402R ima ulogu hemaglutinina i dovodi do stvaranja karakterističnih rozeta u prisustvu eritrocita u ćelijama zaraženim virusom. Takođe, funkcija ovog proteina se povezuje sa razvojem zaštitnog imuniteta. Na osnovu EP402R gena može se odrediti serološka specifičnost soja što bi moglo imati značajan uticaj na zaštitu jedinke od infekcije homolognim sojem (Koltsov i sar. 2023). Gen EP402R se može proučavati *in vitro* gde se na kulturi tkiva, u prisustvu svinjskih eritrocita, može posmatrati pojava efekta hemadsorpcije. Sojevi sa delecijom ovog gena nemaju sposobnost hemadsorpcije. Takvi sojevi su identifikovani u baltičkim zemljama i nakon *in vivo* studija su okarakterisani kao srednjevirentni (Gallardo i sar. 2019). U ovoj studiji, efekat hemadsorpcije je bio prisutan kod

svih izolovanih virusa. Pored toga, budući da mutacije u genu EP402R nisu ustanovljene, svi sojevi iz ove studije su svrstani u serogrupu 8 zajedno sa referentnim sojem Georgia 2007/1 (Qu i sar. 2022). U ovoj studiji, na primarnim alveolarnim makrofagima svinja virus AKS je izolovan sa efektom hemadsorpcije kod 72,7% testiranih uzoraka, dok je na primarnim leukocitima svinja izolovano 91,3% uzoraka. Varijacije u rezultatima mogu proistići iz korišćenja različitih primarnih tkivnih kultura koje zavise od serije ćelija i genskog materijala izvorne jedinke. Varijacije u ekspresiji alveolarnih makrofaga kod različitih jedinki mogu delovati kao neinfektivni faktori u razvoju bolesti, što može dovesti do varijacija u efikasnosti izolacije virusa na tim tkivnim kulturama (du Manoir i sar. 2002; Meloni i sar. 2022). Takođe, efikasnost hemadsorpcije kao indikatorskog sistema za vizualizaciju izolovanog virusa značajno zavisi od kvaliteta korišćenih eritrocita. U ovoj studiji, uspešnost izolacije divljih sojeva virusa AKS bila je veća prilikom korišćenja primarne kulture tkiva leukocita svinja, sa stopom uspešnosti od 91,3%, u poređenju sa stopom uspešnosti od 72,7% kada je korišćena primarna kultura tkiva alveolarnih makrofaga. Carrascosa i sar. (2012) ističu mogućnost upotrebe obe vrste primarnih kultura tkiva naizmenično, uz visoku stopu uspešnosti. Međutim, u našem istraživanju, bolji rezultati postignuti su upotrebom primarne kulture tkiva iz leukocita svinja za izolaciju terenskih sojeva AKS. Dodatno, postupak pripreme primarne kulture tkiva iz leukocita se pokazao tehnički jednostavnijim u odnosu na pripremu primarnih kultura alveolarnih makrofaga. Kod sojeva kod kojih nije uočen efekat HAD postoji mogućnost da se radi o necitopatogenim i HAD-negativnim sojevima te je neophodno izvršiti dalje analize kao što amplifikacija i sekvenciranje EP402R gena ili imunoperoksidazni test radi detekcije antigena.

Uspešnost izolacije virusa zavisi od stanja i kvaliteta korišćenih uzoraka, posebno kada se radi o uzorcima poreklom od uginulih svinja. I pored skladištenja uzoraka na temperaturi od -80 °C, postoji mogućnost degradacije virusnih partikula. Takođe, postoji verovatnoća da u nekim od korišćenih uzoraka nije bilo prisutnog vijabilnog virusa. Neuspeh u izolaciji virusa može biti uslovljen prisustvom drugih mikroorganizama, posebno bakterija i kvasaca, koji negativno utiču na održivost ćelija korišćenih za izolaciju.

Iz rezultata ove studije može se zaključiti da u Srbiji postoji više linija (podgrupa) virusa AKS. Svi analizirani sojevi, uključujući parcijalne sekvence i sekvence celog genoma, mogu se na osnovu analize C terminalnog dela B646L gena i E183L gena klasifikovati kao genotip II. Dodatno, analiza CVR regiona B602L gena ukazuje na to da svi sojevi pripadaju istoj grupi kao referentni soj Georgia 2007/1 (CVR 1), ali su prisutne dve različite linije virusa: dominantna linija 1 čiji je referentni predstavnik Georgia 2007/1 i linija 2 koja sadrži T318A mutaciju. Analizom IGR regiona (I73R i I329L), identifikovana je dominantna grupa IGR II što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje obuhvataju sojeve iz Evrope (Gallardo i sar., 2023). Iako grupi IGR III pripada samo jedan soj, ne može se potpuno isključiti mogućnost cirkulisanja ove grupe virusa. Analizom celih genoma otkriven je veći broj cirkulišućih grupa virusa AKS u Srbiji. Gallardo i sar. (2023) su sojeve iz Srbije iz 2019. godine svrstali u evropsku grupu 6, na osnovu analize ECO 2 regiona. Danas, na osnovu analiza iz ove studije, možemo zaključiti da je genski diverzitet virusa AKS daleko veći nego što je prethodno opisano. Što je u skladu sa prethodnim studijama koje su opisale porast broja sojeva virusa AKS što virus duže cirkuliše u zemlji.

Postoji приметna razlika između broja sekvenciranih uzoraka i broja kvalitetnih sekvenci koje su dobijene. Ovo može biti rezultat različitih faktora uključujući nižu osetljivost prajmera za određene delove genoma ili činjenicu da je korišćena DNK izolovana iz tkiva svinja, a ne iz izolata

virusa sa kultura tkiva. Najuočljivija razlika bila je u IGR regionu koji je veoma varijabilan, pa stoga nije moguće isključiti mogućnost mutacija na mestima vezivanja prajmera.

Zbog toga je ključno nastaviti s ovakvim istraživanjima kako bi se pratilo kretanje sojeva virusa. Takav pristup omogućava bolje razumevanje strukture genoma virusa i potencijalnih promena koje bi mogle uticati na njegove karakteristike. Posebno je važno obratiti pažnju na promene u genskim regionima odgovornim za virulenciju, jer one mogu imati značajne posledice za kliničko prepoznavanje bolesti i posledično na efikasnost sistema kontrole bolesti.

ZAKLJUČCI

1. Svi sojevi virusa AKS u periodu 2019-2023. godina pripadaju genotipu II.
2. Analizom nukleotidnih sekvenci srpskih sojeva utvrđeno je postojanje više podgrupa virusa i to: dve linije na osnovu CVR B602L gena, jedna koja je istovetna sa referentnim sojem iz Gruzije, a druga sa specifičnom mutacijom T318A. Analizom IGR regiona utvrđeno je da je dominantna linija IGR II, dok je istovremeno prvi put u Srbiji identifikovana i linija IGR III.
3. Prostorno vremenskom analizom slučajeva AKS kod divljih svinja od 2020. do 2023. utvrđeno je postojanje pet klastera od kojih su dva pozicionirana u 2020-2021. godini, jedan u 2022. godini i dva klastera u 2023. godini.
4. Sekvenciranjem celih genoma virusa AKS identifikovane su veoma značajne mutacije u sledećim genima i regionima: NP1450L, ECO2, O174L, K145R, MGF, grupi gena ACD, kao i delecija u genu L606L. Ustanovljeno je 10 mutacija za koje se smatra da nisu značajne.
5. Izolacijom virusa na primarnoj kulturi tkiva utvrđeno je da su svi izolati ispoljili efekat hemadsorpcije i da spadaju u istu serogrupu kao i referentni soj Georgia 2007/1.
6. Prilikom izolacije virusa na primarnim kulturama tkiva, ustanovljeno je da je izolacija virusa na primarnoj kulturi leukocita svinja efikasnija sa 91,3 % u poređenju sa primarnom kulturom makrogafa svinja sa 72,7 %.
7. Retrospektivnom molekularnom epizootiološkom analizom dokazano je, da su prva dva žarišta registrovana 2019. godine na teritoriji Srbije nastala kao rezultat unosa virusa iz dva nezavisna, različita izvora.

LITERATURA

1. Agüero M, Fernández J, Romero L, et al (2003) Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 41:4431–4434. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003>
2. Aira C, Monedero A, Hernández-Antón S, et al (2023) Improving African Swine Fever Surveillance Using Fluorescent Rapid Tests. *Pathogens* 12:811. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060811>
3. Alonso C, Borca M, Dixon L, et al (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology* 99:613–614. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001049>
4. Andrés G, Charro D, Matamoros T, et al (2020) The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes. *Journal of Biological Chemistry* 295:1–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.011196>
5. Bao J, Zhang Y, Shi C, et al (2022) Genome-Wide Diversity Analysis of African Swine Fever Virus Based on a Curated Dataset. *Animals* 12:2446. <https://doi.org/10.3390/ani12182446>
6. Bastos ADS, Penrith ML, Cruci Re C, et al (2003) Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* 148:693–706
7. Blome S, Franzke K, Beer M (2020) African swine fever – A review of current knowledge. *Virus Res* 287:198099. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099>
8. Blome S, Gabriel C, Beer M (2014) Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine* 32:3879–3882. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.051>
9. Boinas F, Ribeiro R, Madeira S, et al (2014) The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (Acari: Ixodida) on the Iberian Peninsula. *Journal of Vector Ecology* 39:238–248. <https://doi.org/10.1111/jvec.12098>
10. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, et al (2011) The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal. *PLoS One* 6:e20383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020383>
11. Boshoff CI, Bastos ADS, Gerber LJ, Vosloo W (2007) Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). *Vet Microbiol* 121:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.007>
12. Brellou GD, Tassis PD, Apostolopoulou EP, et al (2021) Report on the First African Swine Fever Case in Greece. *Vet Sci* 8:163. <https://doi.org/10.3390/vetsci8080163>
13. Carmina G, Nieto R, Arias M (2022) Indirect Immunoperoxidase Test (IPT) for Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus (ASFV) on African Green Monkey Cell Lines (Vero, MS). pp 147–158
14. Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P (2011) Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Curr Protoc Cell Biol* 53:. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2614s53>
15. Chen W, Zhao D, He X, et al (2020) A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci* 63:623–634. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1657-9>

16. Chenais E, Depner K, Guberti V, et al (2019) Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porcine Health Manag* 5:6. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2>
17. Chenais E, Ståhl K, Guberti V, Depner K (2018) Identification of Wild Boar–Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic. *Emerg Infect Dis* 24:810–812. <https://doi.org/10.3201/eid2404.172127>
18. Cho K-H, Yoo D-S, Hong S-K, et al (2023) Genetic Profile of African Swine Fever Viruses Circulating at Pig Farms in South Korea during the Outbreaks between 2022 and April 2023. *Viruses* 15:1552. <https://doi.org/10.3390/v15071552>
19. Costard S, Wieland B, De Glanville W, et al (2009) African swine fever: how can global spread be prevented? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:2683. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2009.0098>
20. Costard S, Zagmutt FJ, Porphyre T, Pfeiffer DU (2015) Small-scale pig farmers' behavior, silent release of African swine fever virus and consequences for disease spread. *Sci Rep* 5:17074. <https://doi.org/10.1038/srep17074>
21. Cwynar P, Stojkov J, Wlazlak K (2019) African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* 11:310. <https://doi.org/10.3390/v11040310>
22. Danzetta ML, Marenzoni ML, Iannetti S, et al (2020) African swine fever: Lessons to learn from past eradication experiences. A systematic review. *Front Vet Sci* 7:296. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00296/BIBTEX>
23. de la Vega I, González A, Blasco R, et al (1994) Nucleotide Sequence and Variability of the Inverted Terminal Repetitions of African Swine Fever Virus DNA. *Virology* 201:152–156. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1277>
24. de León P, Bustos MJ, Carrascosa AL (2013) Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res* 173:168–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.013>
25. de Oliveira RP, Hutet E, Paboeuf F, et al (2019) Comparative vector competence of the Afrotropical soft tick *Ornithodoros moubata* and Palearctic species, *O. erraticus* and *O. verrucosus*, for African swine fever virus strains circulating in Eurasia. *PLoS One* 14:e0225657. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0225657>
26. Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, Upton C (2013) African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* 173:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
27. du Manoir JM, Albright BN, Stevenson G, et al (2002) Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 89:175–186. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00207-6)
28. Epifano C, Krijnse-Locker J, Salas ML, et al (2006) The African Swine Fever Virus Nonstructural Protein pB602L Is Required for Formation of the Icosahedral Capsid of the Virus Particle. *J Virol* 80:12260–12270. <https://doi.org/10.1128/JVI.01323-06>
29. European Commission: Animal Disease Information System (2024) ADIS 2024
30. Eustace Montgomery R (1921) On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34:159–191. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4)
31. Faburay B (2022) Genome Plasticity of African Swine Fever Virus: Implications for Diagnostics and Live-Attenuated Vaccines. *Pathogens* 11:145. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020145>

32. Fernández-Pinero J, Gallardo C, Elizalde M, et al (2013) Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. *Transbound Emerg Dis* 60:48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x>
33. Forth J, Forth L, King J, et al (2019) A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences. *Viruses* 11:846. <https://doi.org/10.3390/v11090846>
34. Forth JH, Calvelage S, Fischer M, et al (2023) African swine fever virus – variants on the rise. *Emerg Microbes Infect* 12:2146537. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2146537>
35. Forth JH, Forth LF, Lycett S, et al (2020) Identification of African swine fever virus-like elements in the soft tick genome provides insights into the virus' evolution. *BMC Biol* 18:136. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00865-6>
36. Freitas FB, Frouco G, Martins C, Ferreira F (2018) African swine fever virus encodes for an E2-ubiquitin conjugating enzyme that is mono- and di-ubiquitinated and required for viral replication cycle. *Sci Rep* 8:3471. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21872-2>
37. Gallardo C, Casado N, Soler A, et al (2023) A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front Vet Sci* 10:1112850. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
38. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Pelayo V, et al (2014) Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg Infect Dis* 20:1544–1547. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
39. Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, et al (2009) Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes* 38:85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
40. Gallardo C, Nurmoja I, Soler A, et al (2018) Evolution in Europe of African swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Vet Microbiol* 219:70–79. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2018.04.001>
41. Gallardo C, Soler A, Nurmoja I, et al (2021) Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates. *Transbound Emerg Dis* 68:2826–2841. <https://doi.org/10.1111/tbed.14222>
42. Gallardo C, Soler A, Rodze I, et al (2019) Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis* 66:1399–1404. <https://doi.org/10.1111/tbed.13132>
43. Gallardo MC, Reoyo A de la T, Fernández-Pinero J, et al (2015) African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag* 1:21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
44. Gervasi V, Guberti V (2021) African swine fever endemic persistence in wild boar populations: Key mechanisms explored through modelling. *Transbound Emerg Dis* 68:2812–2825. <https://doi.org/10.1111/tbed.14194>

45. Giammarioli M, Marcacci M, Scicluna MT, et al (2023) Complete Genome of African Swine Fever Virus Genotype II in Central Italy. *Microbiol Resour Announc* 12: <https://doi.org/10.1128/mra.01364-22>
46. Glišić D, Milićević V, Veljović L, et al (2023) Patterns of ASFV Transmission in Domestic Pigs in Serbia. *Pathogens* 12:149. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010149>
47. Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D (2013) African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Res* 173:198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
48. Golnar AJ, Martin E, Wormington JD, et al (2019) Reviewing the Potential Vectors and Hosts of African Swine Fever Virus Transmission in the United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 19:512–524. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2387>
49. Granberg F, Torresi C, Oggiano A, et al (2016) Complete Genome Sequence of an African Swine Fever Virus Isolate from Sardinia, Italy. *Genome Announc* 4: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-16>
50. Guinat C, Gogin A, Blome S, et al (2016) Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Veterinary Record* 178:262–267. <https://doi.org/10.1136/vr.103593>
51. Haresnape JM, Mamu FD (1986) The distribution of ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) in Malawi, and its relation to African swine fever epizootiology. *Journal of Hygiene* 96:535–544. <https://doi.org/10.1017/S0022172400066341>
52. Haresnape JM, Wilkinson PJ, Mellor PS (1988) Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. *Epidemiol Infect* 101:173–185. <https://doi.org/10.1017/S0950268800029332>
53. Iscaro C, Dondo A, Ruocco L, et al (2022) Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. *Transbound Emerg Dis*. <https://doi.org/10.1111/tbed.14584>
54. Jo YS, Gortázar C (2021) African Swine Fever in wild boar: Assessing interventions in South Korea. *Transbound Emerg Dis* 68:2878–2889. <https://doi.org/10.1111/TBED.14106>
55. Jori F, Bastos A, Boinas F, et al (2023) An Updated Review of *Ornithodoros* Ticks as Reservoirs of African Swine Fever in Sub-Saharan Africa and Madagascar. *Pathogens* 12:469. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030469>
56. Karger A, Pérez-Núñez D, Urquiza J, et al (2019) An Update on African Swine Fever Virology. *Viruses* 11:864. <https://doi.org/10.3390/v11090864>
57. Keßler C, Forth JH, Keil GM, et al (2018) The intracellular proteome of African swine fever virus. *Sci Rep* 8:14714. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32985-z>
58. Kim S, Lee S, Jeong H, et al (2021) Rapid emergence of African swine fever virus variants with different numbers of a tandem repeat sequence in South Korea. *Transbound Emerg Dis* 68:1726–1730. <https://doi.org/10.1111/tbed.13867>
59. King DP, Reid SM, Hutchings GH, et al (2003) Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107:53–61. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00189-1)

60. Kleiboeker SB, Burrage TG, Scoles GA, et al (1998) African Swine Fever Virus Infection in the Argasid Host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. J Virol 72:1711–1724. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.1711-1724.1998>
61. Kleiboeker SB, Scoles GA (2001) Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. Anim Health Res Rev 2:121–128. <https://doi.org/10.1079/AHRR200133>
62. Koeltz A, Kolbasov D, Titov I, et al (2018) African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • 24:. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2014.12.002>
63. Koltsov A, Krutko S, Kholod N, et al (2023) Deletion of the CD2 Gene in the Virulent ASFV Congo Strain Affects Viremia in Domestic Swine, but Not the Virulence. Animals 13:2002. <https://doi.org/10.3390/ani13122002>
64. Ladoși I, Păpuș TA, Ladoși D (2023) The impact of african swine fever (ASF) on Romanian pig meat production: A Review. Acta Veterinaria-Beograd 73:1–12. <https://doi.org/10.2478/acve-2023-0001>
65. Lamarche BJ, Kumar S, Tsai M-D (2006) ASFV DNA Polymerase X Is Extremely Error-Prone under Diverse Assay Conditions and within Multiple DNA Sequence Contexts. Biochemistry 45:14826–14833. <https://doi.org/10.1021/bi0613325>
66. Lange M, Siemen H, Blome S, Thulke H-H (2014) Analysis of spatio-temporal patterns of African swine fever cases in Russian wild boar does not reveal an endemic situation. Prev Vet Med 117:317–325. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.08.012>
67. Li Z, Chen W, Qiu Z, et al (2022) African Swine Fever Virus: A Review. Life 12:1255. <https://doi.org/10.3390/life12081255>
68. Liu Q, Ma B, Qian N, et al (2019) Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72. Cell Res 29:953–955. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0232-x>
69. Liu Y, Shen Z, Xie Z, et al (2023) African swine fever virus I73R is a critical virulence-related gene: A potential target for attenuation. Proceedings of the National Academy of Sciences 120:. <https://doi.org/10.1073/pnas.2210808120>
70. Ma W, Lager KM, Richt JA, et al (2008) Development of Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Rapid Detection and Differentiation of Wild-Type Pseudorabies and Gene-Deleted Vaccine Viruses. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20:440–447. <https://doi.org/10.1177/104063870802000405>
71. Malmquist WA, Hay D (1960) Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. American Journal of Veterinary Research 21:104–108
72. Malogolovkin A, Kolbasov D (2019) Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus. Virus Res 271:197673. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197673>
73. Mazloun A, van Schalkwyk A, Chernyshev R, et al (2023) A Guide to Molecular Characterization of Genotype II African Swine Fever Virus: Essential and Alternative Genome Markers. Microorganisms 11:642. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11030642/S1>
74. Mazloun A, van Schalkwyk A, Shotin A, et al (2021) Comparative Analysis of Full Genome Sequences of African Swine Fever Virus Isolates Taken from Wild Boars in Russia in 2019. Pathogens 10:521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>

75. Mazur-Panasiuk N, Walczak M, Juszkiwicz M, Woźniakowski G (2020) The Spillover of African Swine Fever in Western Poland Revealed Its Estimated Origin on the Basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L Genomic Sequences. *Viruses* 12:1094. <https://doi.org/10.3390/v12101094>
76. Mazur-Panasiuk N, Woźniakowski G, Niemczuk K (2019) The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci Rep* 9:4556. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
77. Meloni D, Franzoni G, Oggiano A (2022) Cell Lines for the Development of African Swine Fever Virus Vaccine Candidates: An Update. *Vaccines (Basel)* 10:707. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050707>
78. Milićević V, Kureljušić B, Maksimović Zorić J, et al (2019) First Occurrence of African Swine Fever in Serbia. *Acta Vet Brno* 69:443–449. <https://doi.org/10.2478/acve-2019-0038>
79. Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede (2018) O p e r a t i v n i p r i r u č n i k za sprovođenje kriznog plana za kontrolu i suzbijanje zarazne bolesti afrička kuga svinja. Beograd
80. Moennig V (2015) The control of classical swine fever in wild boar. *Front Microbiol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01211>
81. Muñoz-Pérez C, Bosch J, Ito S, et al (2022) Quantitative Risk Assessment of African Swine Fever Introduction into Spain by Legal Import of Live Pigs. *Pathogens* 11:76. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010076>
82. Murgia M V., Mogler M, Certoma A, et al (2019) Evaluation of an African swine fever (ASF) vaccine strategy incorporating priming with an alphavirus-expressed antigen followed by boosting with attenuated ASF virus. *Arch Virol* 164:359–370. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4071-8>
83. Nguyen VT, Cho K, Mai NTA, et al (2022) Multiple variants of African swine fever virus circulating in Vietnam. *Arch Virol* 167:1137–1140. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05363-4>
84. Niedzwiecki A (2011) Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pigs infected by African swine fever virus. *Mol Med Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.454>
85. Nix RJ, Gallardo C, Hutchings G, et al (2006) Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* 151:2475–2494. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
86. Oh T, Do DT, Vo H Van, et al (2021) The Isolation and Replication of African Swine Fever Virus in Primary Renal-Derived Swine Macrophages. *Front Vet Sci* 8:. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645456>
87. Olesen AS, Kodama M, Lohse L, et al (2021) Identification of African Swine Fever Virus Transcription within Peripheral Blood Mononuclear Cells of Acutely Infected Pigs. *Viruses* 13:2333. <https://doi.org/10.3390/v13112333>
88. Oļševskis E, Guberti V, Seržants M, et al (2016) African swine fever virus introduction into the EU in 2014: Experience of Latvia. *Res Vet Sci* 105:28–30. <https://doi.org/10.1016/j.RVSC.2016.01.006>
89. Penrith M-L, Vosloo W, Jori F, Bastos ADS (2013) African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Res* 173:228–246. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.011>

90. Pepin KM, Borowik T, Frant M, et al (2023) Risk of African swine fever virus transmission among wild boar and domestic pigs in Poland. *Front Vet Sci* 10: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1295127>
91. Pershin A, Shevchenko I, Igolkin A, et al (2019) A Long-Term Study of the Biological Properties of ASF Virus Isolates Originating from Various Regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet Sci* 6:99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099>
92. Petrovan V, Murgia M V., Wu P, et al (2020) Epitope mapping of African swine fever virus (ASFV) structural protein, p54. *Virus Res* 279:197871. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197871>
93. Petrovan V, Rathakrishnan A, Islam M, et al (2022) Role of African Swine Fever Virus Proteins EP153R and EP402R in Reducing Viral Persistence in Blood and Virulence in Pigs Infected with BeninΔDP148R. *J Virol* 96: <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-21>
94. Pikalo J, Schoder M, Sehl J, et al (2020) The African swine fever virus isolate Belgium 2018/1 shows high virulence in European wild boar. *Transbound Emerg Dis* 67:1654–1659. <https://doi.org/10.1111/tbed.13503>
95. Plowright W, Parker J, Peirce MA (1969) African Swine Fever Virus in Ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from Animal Burrows in Tanzania. *Nature* 1969 221:5185 221:1071–1073. <https://doi.org/10.1038/2211071a0>
96. Plowright W, Tustin R, Thomson G, Coetzer J (1994) Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa, 1st edn. South Africa: Oxford University Press, Cape Town
97. Probst C, Globig A, Knoll B, et al (2017) Behaviour of free ranging wild boar towards their dead fellows: potential implications for the transmission of African swine fever. *R Soc Open Sci* 4:170054. <https://doi.org/10.1098/rsos.170054>
98. Puzankova O, Gavrilova V, Chernyshev R, et al (2023) Novel Protocol for the Preparation of Porcine Bone Marrow Primary Cell Culture for African Swine Fever Virus Isolation. *Methods Protoc* 6:73. <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
99. Qu H, Ge S, Zhang Y, et al (2022) A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus. *Virus Genes* 58:77–87. <https://doi.org/10.1007/s11262-021-01879-0>
100. Rathakrishnan A, Reis AL, Goatley LC, et al (2021) Deletion of the K145R and DP148R Genes from the Virulent ASFV Georgia 2007/1 Isolate Delays the Onset, but Does Not Reduce Severity, of Clinical Signs in Infected Pigs. *Viruses* 13:1473. <https://doi.org/10.3390/v13081473>
101. Redrejo-Rodríguez M, Rodríguez JM, Suárez C, et al (2013) Involvement of the Reparative DNA Polymerase Pol X of African Swine Fever Virus in the Maintenance of Viral Genome Stability *In Vivo*. *J Virol* 87:9780–9787. <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
102. Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, et al (2020) Deletion of the Gene for the Type I Interferon Inhibitor I329L from the Attenuated African Swine Fever Virus OURT88/3 Strain Reduces Protection Induced in Pigs. *Vaccines (Basel)* 8:262. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020262>
103. Rodríguez JM, Salas ML (2013) African swine fever virus transcription. *Virus Res* 173:15–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.014>

104. Rowlands RJ, Duarte MM, Boinas F, et al (2009) The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology* 393:319–328. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.040>
105. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, et al (2008) African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1870–1874. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
106. Salas ML, Rey-Campos J, Almendral JM, et al (1986) Transcription and translation maps of african swine fever virus. *Virology* 152:228–240. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90387-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90387-9)
107. Salguero FJ (2020) Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine. *Front Vet Sci* 7:. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00282>
108. Sanchez BC (1963) Reservorios del virus de la Peste Porcina Africana. Investigation del virus de la P. P. A. en las arthropodos mediante la prueba de la hemadsocion. *Bull Off Int Epizootiol* 60:895–899
109. Sánchez EG, Pérez-Núñez D, Revilla Y (2017) Mechanisms of Entry and Endosomal Pathway of African Swine Fever Virus. *Vaccines (Basel)* 5:42. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040042>
110. Sánchez-Vizcaíno JM, Laddomada A, Arias ML (2019) African Swine Fever Virus. In: *Diseases of Swine*. Wiley, pp 443–452
111. Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L (2015) An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *J Comp Pathol* 152:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.003>
112. Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
113. Sargsyan MA, Voskanyan HE, Karalova EM, et al (2018) Third wave of African swine fever infection in Armenia: Virus demonstrates the reduction of pathogenicity. *Vet World*. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.5-9>
114. Sauter-Louis C, Conraths FJ, Probst C, et al (2021a) African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review. *Viruses* 13:1717. <https://doi.org/10.3390/v13091717>
115. Sauter-Louis C, Forth JH, Probst C, et al (2021b) Joining the club: First detection of African swine fever in wild boar in Germany. *Transbound Emerg Dis* 68:1744–1752. <https://doi.org/10.1111/TBED.13890>
116. Shi K, Liu H, Yin Y, et al (2022) Molecular Characterization of African Swine Fever Virus From 2019-2020 Outbreaks in Guangxi Province, Southern China. *Front Vet Sci* 9:912224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.912224>
117. Sun E, Huang L, Zhang X, et al (2021a) Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg Microbes Infect* 10:2183–2193. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>
118. Sun E, Zhang Z, Wang Z, et al (2021b) Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Sci China Life Sci* 64:752–765. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1904-4>
119. Tran HTT, Truong AD, Dang AK, et al (2021) Circulation of two different variants of intergenic region (IGR) located between the I73R and I329L genes of African swine fever virus strains in Vietnam. *Transbound Emerg Dis* 68:2693–2695. <https://doi.org/10.1111/tbed.13996>

120. Tran XH, Le TTP, Nguyen QH, et al (2022a) African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G- Δ I177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. *Transbound Emerg Dis* 69:. <https://doi.org/10.1111/tbed.14329>
121. Tran XH, Phuong LTT, Huy NQ, et al (2022b) Evaluation of the Safety Profile of the ASFV Vaccine Candidate ASFV-G- Δ I177L. *Viruses* 14:896. <https://doi.org/10.3390/v14050896>
122. Vergne T, Guinat C, Petkova P, et al (2016) Attitudes and Beliefs of Pig Farmers and Wild Boar Hunters Towards Reporting of African Swine Fever in Bulgaria, Germany and the Western Part of the Russian Federation. *Transbound Emerg Dis* 63:e194–e204. <https://doi.org/10.1111/tbed.12254>
123. Vilem A, Nurmoja I, Niine T, et al (2020) Molecular Characterization of African Swine Fever Virus Isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens* 9:582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
124. WOAAH (2022) WAHIS. <https://wahis.woah.org/#/in-event/4761/dashboard>. Accessed 27 Mar 2023
125. WOAAH Terrestrial Manual (2024) African swine fever (Infection with African swine fever virus). Section 3.8. Chapter 3.8.1.
126. World Organisation for Animal Health (2023) AFRICAN SWINE FEVER (ASF) – SITUATION REPORT 38
127. Woźniakowski G, Pejsak Z, Jabłoński A (2021) Emergence of African Swine Fever in Poland (2014–2021). Successes and Failures in Disease Eradication. *Agriculture* 2021, Vol 11, Page 738 11:738. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11080738>
128. Yáñez RJ, Bournnell M, Nogal ML, et al (1993) African swine fever virus encodes two genes which share significant homology with the two largest subunits of DNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21:2423–2427. <https://doi.org/10.1093/nar/21.10.2423>
129. Yang J, Zhu R, Zhang Y, et al (2023) SY18 Δ L60L: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with protection against homologous challenge. *Front Microbiol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1225469>
130. Yang Y, Xia Q, Sun Q, et al (2022) Detection of African swine fever virus antibodies in serum using a pB602L protein-based indirect ELISA. *Front Vet Sci* 9:. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.971841>
131. Zani L, Forth JH, Forth L, et al (2018) Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci Rep* 8:6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24740-1>
132. Zhang H, Zhao S, Zhang H, et al (2023a) Vaccines for African swine fever: an update. *Front Microbiol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139494>
133. Zhang X, Wang Z, Ge S, et al (2023b) Attenuated African swine fever virus through serial passaging of viruses in cell culture: a brief review on the knowledge gathered during 60 years of research. *Virus Genes* 59:13. <https://doi.org/10.1007/S11262-022-01939-Z>

Biografija

Dimitrije Glišić rođen je u Užicu 2. avgusta 1995. godine. Završio je Osnovnu školu „Rajak Pavićević” i Srednju školu „Josif Pančić” u Bajinoj Bašti. Godine 2014. upisao je integrisane studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine završio je 2020. godine s prosečnom ocenom 9,45. Iste godine upisao je prvu godinu doktorskih akademskih studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je položio sve predviđene ispite s prosečnom ocenom 9,31. Do sada je učestvovao u objavi 34 naučna rada, od kojih se 27 nalazi na SCI listi. Zaposlen je u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije, ulica Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Dimitrije Glišić

Broj indeksa: 2020/5003

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Izolacija i genska karakterizacija virusa afričke kuge svinja u Srbiji u periodu 2019- 2023. godine“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava niti koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora



U Beogradu, 25.11.2024.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Dimitrije Glišić

Broj indeksa: 2020/5003

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: “Izolacija i genska karakterizacija virusa afričke kuge svinja u Srbiji u periodu 2019- 2023. godine“

Mentor: Prof. dr Sonja Radojičić i dr sci. vet. med. Vesna Milićević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora



U Beogradu, 25.11.2024.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „Izolacija i genska karakterizacija virusa afričke kuge svinja u Srbiji u periodu 2019- 2023. godine“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la:

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 25.11.2024.

Potpis autora 

- **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, kao i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
- **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, kao i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
- **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, kao i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
- **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, kao i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.