

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

6  
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8  
9 1. **Датум и назив органа који је именовео комисију:** Наставно научно веће Факултета  
10 ветеринарске медицине, 261. седница одржана 16.10.2024. године

11  
12  
13 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**  
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**  
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

16  
17 **Проф. др Дејан Крњић**, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2016.  
18 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитет у Београду

19 **Проф. др Радиша Продановић**, ванредни професор, Болести папकारа, 2022. година,  
20 Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

21 **Проф. др Иван Топлак**, редовни професор, Ветреинарска медицина, 2023. година,  
22 Ветеринарски факултет, Универзитет у Љубљани

23  
24  
25 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

26  
27 1. **Име, име једног родитеља, презиме:**  
28 Димитрије, Јован, Глишић

29  
30 2. **Датум рођења, општина, Република:**  
31 02.8.1995, Ужице, Република Србија

32  
33 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе\*:**

34 /

35 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука\*:**

36 /

37 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

38 **Изолација и генска карактеризација вируса афричке куге свиње у Србији у периоду**  
39 **2019-2023. године.**

40  
41 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**  
42 **шема, графикона и сл.):**

43 Докторска дисертација је написана на 88 страна компјутерски обрађеног текста и  
44 садржи следећа поглавља: Увод (3 стране), Преглед литературе (18 страна), Циљеве и  
45 задаци истраживања (1 страна), Материјал и методе (16 страна), Резултати (25 страна),  
46 Дискусија (10 страна), Закључци (1 страна), Литература (10 страна).

47 На почетку дисертације је дат кратак садржај на српском и енглеском језику као и  
48 садржај дисертације.

49 Дисертација је документована с 18 табела, 14 слика и две мапе.

50 Списак литературе чини 133 библиографске јединице од којих је најстарија из 1921, а  
51 најновија из 2024. године.

52  
53 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**  
54 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до**  
55 **500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-**  
56 **није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка**  
57 **референци-навести број референци у докторској дисертацији):**

58 Кандидат у **Уводу** описује афричку кугу свиња као болест великог економског и  
59 социјалног значаја. Афричка куга свиња је перакутно до хронично обољење домаћих и  
60 дивљих свиња високог степена леталитета. Укратко су дати подаци о економским

1 последицама који су забележене у земљама у којима је потврђено присуство узročника  
2 болести у популацији домаћих свиња, као и последице које су забележене у Србији од  
3 прве појаве болести. Кандидат даље наводи податке о таксономији и генској  
4 класификацији вируса. Укратко су описани клинички знаци болести који могу зависити од  
5 генотипа, соја и вируленције вируса, инефективне дозе и улазних врата, као и  
6 карактеристика самог домаћина. Кандидат укратко наводи и методе дијагностике  
7 вируса афричке куге свиња, које подразумевају директно доказивање вируса или  
8 његових структурних делова класичним вирусолошким и молекуларним методама и  
9 индиректно, доказивањем хуморалног имунолошког одговора применом серолошких  
10 метода. Наведен је и кратак опис изолације вируса на примарним културама ткива као  
11 што су леукоцити и макрофаги свиња и појединим континуираним ћелијским линијама  
12 као што су MA-104 или VERO. Кандидат наводи да тренутно не постоји регистрована  
13 вакцина у Европи против вируса афричке куге свиња, те да се контрола болести  
14 заснива на примени добрих биосигурносних мера, контроли промета животиња и  
15 намирница анималног порекла као и нешкодљивим уклањањем инфицираних домаћих  
16 свиња и лешева дивљих свиња. Надаље, кандидат описује и први случај афричке куге  
17 свиња у Србији из 2019. године који је регистрован у селу Рабровац-Шуме.

18 **Преглед литературе** кандидат започиње наводима етиолошких података о вирусу, који  
19 су подељени у потпоглавља која се баве грађом, генотипизацијом вируса и његовом  
20 отпорношћу. Затим следи поглавље са епизоотиолошким подацима које садржи први  
21 опис афричке куге свиња из 1910. године, која је регистрована у протекторату источне  
22 Африке (данашња Кенија). Затим следе подаци о ширењу вируса у Африци током  
23 двадесетог века, као и описи првог ширења вируса у истом периоду у Европи. Кандидат  
24 цитира податке о првој појави вируса у Португалији 1957. године као и ширењу по  
25 Пиринејском полуострву, све до ерадикације вируса, 35 година касније 1995. године. У  
26 овом потпоглављу се наводи и први опис преноса вируса путем вектора, крпеља рода  
27 *Ornitodoros spp.*, који су присутни у Африци, Пиринејском полуострву као и југоисточној  
28 Европи. Затим се цитирају подаци о тренутној панзоотији која је почела 2007. године  
29 првим потврђеним случајем болести у Грузији. Општеприхваћена претпоставка је да је  
30 вирус, најсличнији сојевима из Мозамбика и Мадагаскара, унет преко контаминираних  
31 помија преко луке Поти на обали Црног Мора. Касније, исте године, вирус је детектован  
32 у Јужној Осетији, Јерменији и Азербејџану. Угинуле дивље свиње су пронађене крајем  
33 године на Кавказу, на југу Русије. Кандидат у овом потпоглављу наводи и податке  
34 ширења болести у државама Европске Уније као и прве забележене случајеве  
35 обољења у Србији и земљама у региону. Наводе се врсте пријемчиве на инфекцију  
36 вирусом које обухватају дивље афричке свиње (брадавичаста свиња *Phacochoerus*  
37 *africanus*, пустињска брадавичаста свиња *Phacochoerus aethiopicus*) и речна свиња  
38 *Potamochoerus larvatus*) и домаћа свиња (*Sus scrofa domestica*), али се сматра се да су прави домаћини  
39 вируса крпељи. У **Уводу** су описани и начини преношења вируса, силватични циклус,  
40 циркулација вируса у популацији домаћих свиња без присуства компетентних вектора,  
41 циркулација вируса између дивљих и домаћих свиња и циркулација вируса код дивљих  
42 свиња. Даље се цитирају литературни подаци везани за патогенезу болести, најчешћи  
43 начин инфицирања који подразумева оро-назални унос патогена, и ширење вируса  
44 путем лимфних и крвних судова до секундарних органа уз описе клиничких знакова  
45 болести (перакутни, акутни и хронични ток). У потпоглављу изолације вируса, посебна  
46 пажња је посвећена дијагностици, и детаљно су описане најчешће коришћене примарне  
47 културе ткива и континуиране ћелијске линије пореклом од свиња, као и континуиране  
48 ћелијске линије пореклом од мајмуна. Уз то, описане су методе дијагностике вирусних  
49 антигена као и молекуларне методе детекције делова нуклеинске киселине вируса,  
50 затим серолошке методе детекције антитела синтетисаних као одговор на инфекцију. У  
51 поглављу Превенција и контрола описани су покушаји формулација вакцина против  
52 афричке куге свиња као најоптималније стратегије за превенцију и контролу болести, уз  
53 закључак да до данас није развијена ни једна вакцина задовољавајућих  
54 карактеристика.

55  
56 У поглављу **Циљеви и задаци** наведено је да су они обухватили изолацију и генску  
57 карактеризацију вируса афричке куге свиња у Србији у периоду 2019-2023. године  
58 испитивањем репрезентативног броја сојева вируса у односу на врсту домаћина  
59 применом класичних вирусолошких и молекуларних метода. Циљеви и задаци су  
60 обухватили и генотипизацију и утврђивања подгенотипова вируса анализом четири

1 генска сегмента. Уз то, планирано је и посредно утврђивање вируленције српских  
2 сојева вируса афричке куге свиња изолацијом на примарним ћелијским линијама, као и  
3 откривање промена у генском материјалу секвенцирањем целог генома вируса.

4 Ради остваривања постављених циљева ове докторске дисертације дефинисани су  
5 следећи задаци:

- 6 1. Тријажно тестирање позитивних узорака из банке узорака Научног института за  
7 ветеринарство Србије real-time PCR методом; одабир најмање 90 погодних  
8 узорака ( $Ct < 25$ ) за даља молекуларна испитивања у односу на врсту и  
9 просторно-временску дистрибуцију (5 узорака по округу у ком је пријављена  
10 афричка куге свиња, по години од 2019-2023). Селекција узорака се вршила у  
11 Microsoft Excel програму (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington, SAD).
- 12 2. Екстракција вирусне ДНК из одабраних узорака и амплификација четири генска  
13 маркера одабраних узорака коришћењем прајмера препоручених од стране  
14 Референтне лабораторије ЕУ за афричку кугу свиња применом методе  
15 класичног PCR; издвајање PCR производа специфичне дужине, пречишћавање  
16 и Sanger секвенцирање (LGC Genomics GmbH, Berlin, Nemačka).
- 17 3. Анализа нуклеотидних секвенци применом софтвера GeneiousPrime (Geneious  
18 Prime, Dotmaticus, Boston, Masačusets, SAD) и филогенетска анализа узорака у  
19 софтверу Molecular Evolutionary Genetic Analysis - MEGA X (Pensilvaniја, SAD);  
20 депоновање обрађених секвенци у банку гена Националног центра за  
21 биотехнолошке информације (NCBI GenBank, Maryland, SAD).
- 22 4. Одабир и припрема најмање 20 позитивних узорака погодних за изолацију  
23 вируса на примарним ћелијским линијама пореклом од алвеоларних макрофага  
24 свиња и леукоцита свиња. Одабир узорака је извршен након филогенетске  
25 анализе и утврђивања свих варијанти вируса афричке куге свиња који  
26 циркулишу у Србији.
- 27 5. Припрема примарних ћелијских култура пореклом од алвеоларних макрофага  
28 свиња и леукоцита свиња; инокулација примарних ћелијских култура  
29 припремљеним позитивним материјалима; свакодневно праћење појаве  
30 цитопатогеног ефекта (ЦПЕ) и хемадсорпције.
- 31 6. Секвенцирање целог генома најмање 5 узорака одабраних на основу  
32 концентрације и чистоће нуклеинске киселине; секвенцирање методом „shotgun“  
33 на Illumina платформи (Milton, Cambridge, UK).
- 34 7. Анализа целих секвенци вируса афричке куге свиња применом компјутерских  
35 програма GeneiousPrime (Geneious Prime, Dotmaticus, Boston, MA, SAD) и  
36 депоновање у NCBI.

37 У поглављу **Материјал и методе** наводи се да су за потребе овог испитивања узорци  
38 за испитивање узети из банке узорака Научног института за ветеринарство Србије који  
39 је Национална референтна лабораторија за ову болест. Узорци су узети од  
40 одстрелених дивљих свиња, угинулих дивљих и домаћих свиња, као и оболелих  
41 домаћих свиња у оквиру пасивног и активног надзора на присуство вируса афричке куге  
42 свиња. Узорци су, у зависности од типа (органи, брисеви) били припремљени за даља  
43 испитивања на следећи начин: органи (слезина, бубрег) су били хомогенизовани тучком  
44 и тариоником и припремљени као 10% суспензија у минималној есенцијалној подлози  
45 (MEM) са додатком антибиотика (гентамицин 120mg/l). Суспензија органа је била  
46 центрифугирана на 1500 x g током 10 минута, а супернатант се користио за даља  
47 испитивања. Брисеви су били припремљени потапањем у 1 ml MEM, затим  
48 хомогенизовани у апарату TissueLyser LT (QIAGEN, Venlou, Holandija) и центрифугирани  
49 на 1500 x g током 10 минута. За даља испитивања је коришћен супернатант.

50 За добијање вирусне ДНК изведена је аутоматска екстракција ДНК из припремљених  
51 супернатаната органа и брисева употребом комерцијалног кита (IndiSpin Pathogen Kit,  
52 Indical, Nemačka), према упутству произвођача и коришћењем QIAcube Connect  
53 аутоматског екстрактора (QIAGEN, Venlou, Holandija). Тријажно тестирање је извршено  
54 на 280 узорака пореклом од дивљих свиња и 174 узорка од домаћих свиња из  
55 четрнаест округа Србије (Средњебанатски, Јужнобанатски, Град Београд, Подунавски,  
56 Браничевски, Борски, Поморавски, Расински, Зајечарски, Нишавски, Пиротски,  
57 Јабланички, Топлички, Пчињски), у периоду од јуна 2019. до марта 2023. године.  
58 Тријажно тестирање је изведено real time PCR тестом по протоколу описаном од  
59 стране Кинга и сарадника (2003) употребом комерцијалног кита (Luna® Universal Probe  
60 qPCR Master Mix, New England Biolabs, Ipswich, Masačusets, SAD). Реакциона смеша се

1 састојала од 6 µl Luna Universal Probe qPCR Master Mix, 0,5 µl сваког прајмера (10 µM),  
 2 0,25 µl пробе (10 µM), 2,75 µl воде и 2,5 µl нуклеинске киселине. Температурни профил  
 3 током којег се вршила амплификације дела генома је била: почетна денатурација на 95  
 4 °C у трајању од 1 минута, затим 50 циклуса денатурације на 95 °C 15 секунди и  
 5 елонгације на температури од 60 °C у трајању од 30 секунди. Коришћен је PCR апарат  
 6 QIAGEN QIAquant 96 plate (QIAGEN, Venlou, Holandija).

7 Генска карактеризација вируса је обухватила умножавање четири генска маркера и то  
 8 B646L, E183L, B602L и интергенског региона између I73L и 329L гена. За амплификацију  
 9 ових генских маркера су коришћени раније објављени прајмери наведени у Табели 1 и  
 10 комерцијални кит (QIAGEN HotStarTaq Master Mix, Les Ulis, Francuska). Реакциона  
 11 смеша се састојала од 7,5 µl HotStar Master Mix, 0,7 µl сваког прајмера (10 µM), 9,1 µl  
 12 воде и 2 µl нуклеинске киселине. Температурни профил током којег се вршила  
 13 амплификација делова генома су били: почетна денатурација на 95 °C у трајању од 15  
 14 минута, 40 циклуса денатурације на 95 °C у трајању од 30 секунди, везивања прајмера  
 15 за B646L, E183L и B602L ген на 50 °C у трајању од 30 секунди и 60 °C, I73L – I329L гене  
 16 у трајању од 30 секунди, и елонгације на температури од 72 °C у трајању од 1 минута.  
 17 Финалном елонгацијом у трајању од 10 минута на 72 °C су биле завршене све реакције.  
 18 Коришћен је апарат PCR Eppendorf Mastercycler. Добијени PCR производи су били  
 19 визуализовани на 1,5% агарозном гелу, после електрофорезе на 60 V током 60 минута.  
 20 PCR производи специфичне дужине су били пречишћени коришћењем GeneJET PCR  
 21 Purification Kit (ThermoFisher Scientific, SAD) и секвенцирани у Сервису за секвенцирање  
 22 (LGC Gemomics GmbH, Berlin, Nemačka), коришћењем Sanger методологије.  
 23

СЕКВЕНЦА ПРАЈМЕРА	ДУЖИНА PCR ПРОИЗВОДА	ГЕН	РЕФЕРЕНЦА
P72- U [5'- GGCACAAGTTTCGGACATGT - 3']	478 bp	B646L	Boshoff i sar., 2007.
P72-D [5'- GТАСТGТААСGСAGСACAG- 3']			
ЕСО1А [5'-ССАТТТАТСССССGCTTTGG- 3']	356 bp	IGR I73- I329L	Gallardo i sar., 2014.
ЕСО1В [5'-ТСGТCАТCCTGAGACAGCAG- 3']			
PPA89 [5'- TGTAATTTTCATTGCGCCACAAC - 3']	558 bp	E183L	Gallardo i sar., 2009.
PPA722 [5'- CGAAGTGCATGTAATAAACGTC - 3']			
CVR1 [5'- АСТТТGAAACAGGAAAC (AT) AATGATG -3']	350-400 bp	B602L	Gallardo i sar., 2011.
CVR2 [5'- АТАТТТТGТААТАТGTGGGCTGCTG- 3']			

24  
 25 Табела 1. Списак прајмера који се користио за генотипизацију вируса афричке куге  
 26 свиња.

27  
 28 Добијене секвенце су биле анализирани коришћењем софтвера GeneiousPrime  
 29 (Geneious Prime, Dotmaticus, Boston, Massachusetts, SAD) док је филогенетска анализа  
 30 извршена у софтверу MEGA X. Обрађене секвенце су биле депоноване у банку гена  
 31 NCBI (GenBank, Maryland, SAD). Алгоритми који су коришћени за филогенетску анализу  
 32 су одређени коришћењем опције „Best Fit Models“ MEGA X програма. Модели са  
 33 најнижим вредностима су били коришћени за анализу. Поређење се вршило са другим  
 34 секвенцама из банке гена и то: поређење добијених секвенци B646L гена се вршило са  
 35 секвенцама AF301537.1, MZ682070.1, OP019317.1, MT851941.1, MT840356.1,  
 36 KJ496127.1, KJ526369.1, AF270711.1, DQ250121.1, DQ250117.1, DQ250125.1,  
 37 KY353989.1, AF449477.1, DQ250123.1, AF504886.1, DQ250112.1, DQ250122.1,  
 38 DQ250119.1, KM236553.1, AY351555.1, AF270707.1, AY494552.1, AY494551, AY351561,  
 39 AY351522.1 AY351542.1, KT795354.1, AY351564.1, AY351530.1 који представљају 24  
 40 генотипа вируса афричке куге свиња; поређење добијених секвенци E183L гена се

1 вршило са секвенцама AY261360, AY261362, AY261363, AY261364, AY261366,  
2 FJ174420, FJ174421, FJ174422, FJ174425, FJ174430, FR682468, X84889, а поређење  
3 добијених секвенци B602L гена се вршило са MT300325.1, KY372397, KY372398,  
4 MN809122, MW361944.1, MW451102.1, MW451105, ON075797, OP628183, ON098019,  
5 ON098023, JX857523.1, MT647531.1, MT647535.1, MT647548.1, OK358673, JX857530,  
6 JX857532, KJ627200, KJ627200, MT647533, MT647532.1, MT647550, MT647544,  
7 MT647545, MT647546, MT647551, MT647547, MT647552, MT647549, MT647553,  
8 KJ627206, KJ627204, KJ627205, KJ627203, JX857535, док су добијене секвенце IGR  
9 I73R и I329L гена биле поређене са представницима сваког од 4 подгенотипа (IGR I-IV) и  
10 to IGR I MW306190, FR682468, MK189457, затим IGR II KJ620037, MT847621, MT847620,  
11 MN715134, IGR III MK670729, MT889536 и IGR IV OQ030919 и OQ030929.

12 Примарна ћелијска култура пореклом од алвеоларних макрофага била је припремљена  
13 од плућа жртвованог прасета старог 2-3 недеље. Техника бронхоалвеоларне лаваже је  
14 изведена тако што се у плућа, кроз трахеју, сипало 500 ml фосфатног пуферског  
15 раствора са додатком гентамицина (50 mg/ml и хепарина 40 i.j./ml), душник је затворен  
16 форцепсом, а плућа масирана један минут. Поступак је поновљен два пута. Наливени  
17 пуфер је потом одливен из плућа у стерилну боцу од 1 l и на 4 °C допремљен у  
18 лабораторију. Бронхоалвеоларна течност је разливена у тубе од 250 ml и  
19 центрифугирана на 1500 x g у трајању од 15 минута. Преципитат је ресуспендован у 50  
20 ml фосфатног пуферског раствора у тубама запремине 50 ml и центрифугиран 2 минута  
21 на 1500 x g. После још два поновљена испирања, супернатант је одливен, а исталожене  
22 ћелије ресуспендоване у 5ml MEM са 10% феталног телећег серума (FBS Gibco,  
23 ThermoFisher, SAD). Овако припремљене ћелије су избројане у Науберовој коморици  
24 и разређене у MEM (10% FTS) тако да их је било 400 000 у 100 µl колико је сипано у  
25 бунаре 96 бунарске плоче. Извођење огледа је одобрено Решењем Министарства  
26 пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије број 323-07-03560/2023-  
27 05/3 од 12.4.2023. године.

28 Примарна ћелијска линија пореклом од леукоцита свиња је припремљена од 500 ml  
29 пуне крви клинички здравих свиња старијих од 3 месеца. Крв је узета у боце од 500 ml  
30 са антикоагулансом (хепарин 40 i.j./ml, 100 i.j./ml пеницилина и 0,1 mg/ml  
31 стрептомицина) и на температури од 37 °C и под углом од 45° допремљена у  
32 лабораторију. Након 30-60 минута када се исталожила већина еритроцита, одливена је  
33 леукоцитима богата горња фаза (1/3 укупног волумена) и затим мешана са 2/3  
34 запремине фосфатног пуфера (20 i.j./ml хепарина). Ћелије су затим центрифугиране у  
35 трајању од 5 минута на 1000 x g на собној температури. Издвојени супернатант је  
36 одливен, а исталожене ћелије ресуспендоване у 2/3 запремине фосфатног пуфера (20  
37 i.j./ml хепарина). Корак испирања и центрифугирања је поновљен још два пута после  
38 чега је вршено лизирање преосталих еритроцита. Исталожене ћелије су  
39 ресуспендоване у 2,5 ml фосфатног пуфера (20 i.j./ml хепарина) с 5% аутологног  
40 свињског серума уз додавање 0,6 ml пуфера за лизирање еритроцита (8,3 g NH<sub>4</sub>Cl у 1 l  
41 дестиловане воде). Након 4-5 минута пажљивог пипетирања у леденом раствору (4 °C)  
42 вршено је лизирање преосталих еритроцита. Остаци еритроцита су уклоњени  
43 додавањем 5 ml MEM с 5% аутологног серума (20 i.j./ml хепарина) и центрифугирани  
44 два пута на температури од 4 °C у трајању од 5 минута. Добијени леукоцити су  
45 ресуспендовани у MEM са додатком 10% аутологног свињског серума. Виталност  
46 леукоцита је била процењена бојењем трипан плавим. Овако припремљени леукоцити  
47 су били избројани у Науберовој коморици и разређени у MEM (10% FTS) тако да их је  
48 било 300 000 у 100 µl колико је сипано у бунаре 96 бунарске плоче. Примарне  
49 леукоцитне ћелије су узгајане у RPMI подлози (RPMI, Gibco, ThermoFisher, SAD) са  
50 додатком антибиотика (Mycosap, Bioscience Lonza, Morrisville, SAD) на 37 °C и у  
51 атмосфери с 5% CO<sub>2</sub>.

52 За изолацију вируса је одабрано 22 узорка који су представници свих варијанти вируса  
53 који циркулишу у Србији, а на основу филогенетске анализе. Претходно припремљени  
54 супернатанти су били филтрирани кроз мембранске филтере промера 0,45 µm  
55 (Millipore, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Немачка). Примарни алвеоларни макрофаги су били  
56 узгајани на 96 бунарској плочи током 24 h, а затим инокулисани претходно  
57 припремљеним узорцима (супернатант) у односу 1:10, док су примарни леукоцити  
58 свиња узгајани у 96 бунарској плочи током 48-72 h односно до матурације леукоцита, а  
59 затим инокулисани узорцима, такође у односу 1:10. После 24 h, у сваки бунар је додато  
60 20 µl 1% суспензије свежих свињских еритроцита припремљених у фосфатном пуферу.

1 Инокулисане ћелије су инкубиране на температури од 37 °C током 7 дана. Ћелије су  
2 свакодневно посматране под светлосним микроскопом (Leica DMLB, LEICA, Wetzlar,  
3 Немачка) ради праћења појаве цитопатогеног ефекта или хемадсорпције. У случају  
4 појаве цитопатогеног ефекта и/или хемадсорпције, извршено је потврдно PCR  
5 тестирање изолата на присуство вируса афричке куге свиња. Такође, због  
6 диференцијалне дијагностике, извршено је тестирање изолата на присуство вируса  
7 лажног беснила (Аујецкијева болест) PCR тестом у реалном времену по протоколу  
8 претходно описаном од стране Ма и сар. (2008).

9 За секвенцирање целог генома је изабрано 5 узорак на основу концентрације и  
10 чистоће екстракованих нуклеинских киселина што је одређено спектрофотометријским  
11 мерењем (NanoDrop, ThermoFisher, SAD) адсорбанце УВ зрака на 280 nm, 260 nm и 230  
12 nm. Погодни узорци за секвенцирање целог генома имају концентрацију нуклеинске  
13 киселине 1,8-2 ng/ml, однос адсорбанце 280/260 nm испод 1,8 и однос адсорбанце  
14 260/230 nm између 2 и 2,2. Узорци су били секвенцирани „shotgun“ методом на Illumina  
15 платформи у Сервиру за секвенцирање Novogene (Milton, Cambridge, UK). Добијене  
16 секвенце су биле анализирани у компјутерском програму GeneiousPrime (Geneious  
17 Prime, Dotmaticus, Boston, Massachusetts, SAD) и депоноване у банку гена NCBI (GenBank,  
18 Maryland, SAD).

19 Број узорака по округу и врсти је одређен употребом платформе Epitools (Ausvet,  
20 Australija, <https://epitools.ausvet.com.au/randomnumbers>) и применом опције насумичног  
21 избора узорака из оквира узорковања док је просторно–временска анализа и израда  
22 мапа извршена употребом DIVA-GIS (<https://www.diva-gis.org/>) и SaTScan  
23 (<https://www.satscan.org/>) програмских пакета. Координате коришћене у анализи као и за  
24 израду мапа су добијене од Републичке ветеринарске инспекције. За просторно  
25 временску анализу коришћен је програмски пакет SaTScan на следећи начин: креиран  
26 је CaseFile; узорцима су додељени генерисани ИД бројеви; креиран је документ с  
27 подацима о географској ширини и дужини за сваки узорак; период проучавања (*Study*  
28 *period*, eng.) је подешен од 2020. до 2023. године; временска прецизност (*Time precision*,  
29 eng.) је подешена на годину дана; изабран је просторно-временски (*Space-Time*, eng.)  
30 тип анализе; модел вероватноће је подешен на просторно-временску пермутацију  
31 (*Space-time permutation*, eng.); начин скенирања је подешен на високе стопе (*High rates*,  
32 eng.); симулација за израчунавање р вредности је подешена на Монте-Карло метод  
33 заснован на хипотези нулте расподеле тј. одсуству кластера. Критеријум за секундарне  
34 кластере је подешен тако да нема центра једног кластера у другом кластеру. Узорци из  
35 2019. године нису коришћени у анализи зато што није било позитивних узорака код  
36 дивљих свиња.

37 У поглављу **Резултати** кандидат је систематизовано, у односу на постављене задатке,  
38 представио резултате истраживања.

39 Од 454 узорка који су реаговали позитивно на real time PCR изабрано је 95 узорака с Ct  
40 вредношћу испод 25 за секвенцирање и филогенетску анализу. Од 95 испитаних  
41 узорака, код 64 (67,4 %) узорака успешно су амплификована и секвенцирана сва четири  
42 молекуларна маркера. Од 95 испитаних узорака код 5 (5,3 %) успешно су  
43 амплификована и секвенцирана три дела генома (B646L, E183L и B602L). Од 95  
44 испитаних узорака код 11 (11,6 %) успешно су амплификовани и секвенцирани B646L и  
45 E183L делови генома, а код три (3,2 %) узорка успешно су амплификовани и  
46 секвенцирани само B646L и B602L ген, такође код три (3,2 %) узорка успешно су  
47 амплификовани и секвенцирани само E183L и B602L гени. Од 95 испитаних узорака код  
48 два (2,1 %) је извршена само амплификација и секвенцирање B646L гена, код 6 (6,3 %) је  
49 извршена амплификација и секвенцирање само E183L гена, код 1 (1,1 %) је извршена  
50 амплификација и секвенцирање само B602L гена. Нуклеотидне секвенце су  
51 депоноване у банку гена (NCBI GenBank, Maryland, SAD) под бројевима OQ336124–  
52 OQ336192 и OQ060619–OQ060634. Филогенетском анализом је утврђено да сви узорци  
53 афричке куге свиња из Србије припадају генотипу II чији је референтни представник сој  
54 Georgia 2007/1 (FR682468.2). Од 95 секвенцираних сојева, добијено је 89 (93,7 %) секвенци  
55 високог квалитета. Секвенце анализирани у овој студији (OQ335972-  
56 OQ336061) су поређене са одговарајућим секвенцама из NCBI базе података. Секвенце  
57 AY261360, AY261362, AY261363, AY261364, AY261366, FJ174420, FJ174421, FJ174422,  
58 FJ174425, FJ174430, FR682468 и X84889 су додате као секвенце које представљају  
59 различите подгенотипове који се могу диференцирати секвенцирањем E183L гена и  
60 представљају секвенце изван групе генотипова I, V, VIII, X. Генском анализом нису

1 установљене мутације у овом делу генома код локалних сојева, а сви сојеви афричке  
2 куге свиња су груписани унутар генотипа II. Од 95 узорака, високо квалитетне секвенце  
3 CVR региона B602L гена добијене су за 76 сојева (80 %). Секвенце су депоноване у  
4 NCBI GenBank под приступним бројевима OQ336062-OQ336123 и OQ060635-OQ060650.  
5 Секвенце CVR добијене из сојева у овој студији су поређене са 104 секвенце генотипа II  
6 вируса афричке куге свиња преузете из NCBI базе података. Филогенетском анализом  
7 се на основу B602L гена може разликовати шест подгрупа вируса. Сојеви из ове студије  
8 сврставају се у четири различите подгрупе. Већина сојева је груписана заједно са  
9 референтним сојем ASFV Georgia 2007/1 (подгрупа I). Сој SRB/2021/5431 припада  
10 засебној подгрупи (подгрупа II). Остали сојеви из ове студије са променом T318A  
11 груписани су у подгрупу III. Три соја из ове студије су груписани у подгрупу IV. Од 76  
12 секвенци које су коришћене у анализи B602L гена, код 16 (21.1 %) је установљена  
13 синонимна мутација T318A у оквиру B602L гена. Код соја SRB/2020/7511 пронађене су  
14 три промене нуклеотида. Једна од њих је синонимна T318A, док је друга несинонимна  
15 G522A што је резултирало у промени аминокиселине Met184Ile у аминокиселинској  
16 секвенци B602L гена. Трећа несинонимна промена T583A је довела до промене  
17 Cis195Ser аминокиселинске секвенце B602L гена. Замена метионина изолеуцином и  
18 цистеина серином у соју SRB/2020/7511 није довела до промене поларитета бочног  
19 ланца аминокиселине. Код SRB/2021/5431 установљене су две нуклеотидне промене,  
20 синонимна T572A и несинонимна T642C промена нуклеотида, што је резултирало  
21 Asn191Val у аминокиселинској секвенци. Замена аспарагинске аминокиселине валином  
22 у SRB/2021/5431 довела је до промене поларитета бочног ланца протеина. Осталих 60  
23 сојева је у потпуности подударно са референтним сојем ASFV Georgia 2007/1  
24 (FR682468.2). Од 64 секвенце коришћене у анализи, код седам (10,9 %) секвенци је  
25 забележена инсерција 245T, док је код шест (9,4 %) забележена несинонимна мутација  
26 C54A. Код 63 (98,6 %) секвенце забележено је присуство три понављајућа  
27 „TATATAGGAA“ сегмента што омогућава класификацију ових сојева у IGR II групу, а код  
28 соја SRB 2022/777 присуство четири „TATATAGGAA“ сегмента што омогућава  
29 класификацију овог соја у IGR - III групу. Од свих пет узорака који су изабрани за  
30 секвенцирање целог генома добијене су високо квалитетне секвенце. Секвенце су  
31 депоноване у NCBI GenBank и додељени су им приступни бројеви OR660695 -  
32 OR660699. Секвенце добијене у овој студији су поређене са 7 секвенци целих генома  
33 преузетих из NCBI. Филогенетском анализом се могу разликовати три подгрупе сојева.  
34 Сојеви NC044959, ON108571, LR722599 припадају првој подгрупи, сојеви MT847622,  
35 MT847622, LR899193 се издвајају у другу подгрупу, док су се сојеви из ове студије  
36 издвојили у трећу подгрупу заједно са MK543947 сојем. Анализом нуклеотидних  
37 секвенци целих генома, установљене су промене у различитим генима у односу на  
38 нуклеотидну секвенцу референтних сојева NC044959 (ASFV Georgia 2007/1) и LR899193  
39 (ASFV Germany 2020/1). Од 22 инокулисана узорка вируса афричке куге свиња, у првих  
40 24 сата изоловано је 10 узорака (45,5 %) са ефектом хемадсорпције. Након 48 сати, број  
41 изолованих узорака повећао се на 12 (54,5 %). Након 72 сата и друге пасаже, укупно је  
42 изоловано 16 узорака (72,7 %). Од 22 инокулисана узорка, вирус афричке куге свиња је  
43 успешно изолован код 20 узорака (91,3 %) са ефектом хемадсорпције. Присуство  
44 вируса је забележено у 15 узорака (68,2 %) 24 сата након инокулације. Након 48 сати,  
45 број позитивних узорака је био 18 (81,8 %). Коначан број од 20 позитивних узорака (91,3  
46 %) постигнут је након 72 сата. Просторно-временском анализом појаве афричке куге  
47 свиња, установљено је постојање пет кластера.

48  
49 У поглављу **Дискусија**, сумирајући целокупне резултате истраживања, кандидат указује  
50 да у Србији постоји више линија (подгрупа) вируса афричке куге свиња који циркулишу  
51 у популацији домаћих и дивљих свиња, као и да је генски диверзитет вируса афричке  
52 куге свиња далеко већи него што је претходно описано. Кандидат описује да се  
53 секвенцирањем целог генома вируса могу установити додатне промене у геному које  
54 могу имати велики значај на еволуцију вируса, док је ретроспективном анализом сојева  
55 из 2019. године установљено да су прва два жаришта афричке куге свиња настала из  
56 два различита уноса вируса у земљу.

57  
58 У **списку литературе**, кандидат наводи 133 релевантних библиографских јединица од  
59 којих је 93,8% објављено у последњих 20 година, односно 84,5% у последњих 10  
60 година.

1  
2 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**  
3 **дисертацији):**

4 На основу добијених резултата истраживања изведени су следећи закључци:

- 5  
6 1. Сви сојеви вируса афричке куге свиња у периоду 2019-2023. година припадају  
7 генотипу II.  
8 2. Анализом нуклеотидних секвенци српских сојева утврђено је постојање више  
9 подгрупа вируса и то: две линије на основу CVR B602L гена, једна која је истоветна са  
10 референтним сојем из Грузије, а друга са специфичном мутацијом T318A. Анализом  
11 IGR региона утврђено је да је доминантна линија IGR II, док је истовремено, први пут у  
12 Србији идентификована и линија IGR III.  
13 3. Просторно временском анализом случајева афричке куге свиња код дивљих  
14 свиња од 2020. до 2023., утврђено је постојање пет кластера од којих су два  
15 позиционирана у 2020-2021. години, један у 2022. години и два кластера у 2023. години.  
16 4. Секвенцирањем целих генома вируса афричке куге свиња идентификоване су  
17 веома значајне мутације у следећим генима и регионима: NP1450L, ECO2, O174L,  
18 K145R, MGF, групи гена ACD, као и делеција у гену L606L. Установљено је 10 мутација  
19 за које се сматра да нису значајне.  
20 5. Изолацијом вируса на примарној култури ткива утврђено је да су сви изолати  
21 испољили ефекат хемадсорпције и да спадају у исту серогрупу као и референтни сој  
22 Georgia 2007/1.  
23 6. Приликом изолације вируса на примарним културама ткива, установљено је да  
24 је изолација вируса на примарној култури леукоцита свиња ефикаснија са 91,3 % у  
25 поређењу са примарном културом макрогафа свиња са 72,7 %.  
26 7. Ретроспективном молекуларном епизоотиолошком анализом доказано је, да су  
27 прва два жаришта регистрована 2019. године на територији Србије настала као  
28 резултат уноса вируса из два независна, различита извора.  
29

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

34 Приказ и тумачење резултата истраживања су у складу са постављеним циљевима  
35 докторске дисертације. Добијене резултате кандидат је приказао табеларно,  
36 графиконима, картограмима и фотографијама; описи и тумачења резултата су јасни,  
37 детаљни и свеобухватни, у складу са најновијим научним сазнањима. Изведени  
38 закључци произилазе из добијених резултата, логични су и јасно формулисани.  
39

40 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

41  
42 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**  
43 **теме?**

44 Докторска дисертација кандидата Димитрија Глишића под насловом „Изолација и  
45 генска карактеризација вируса афричке куге свиње у Србији у периоду 2019-2023.  
46 године“ је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.  
47

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

50 Докторска дисертација кандидата Димитрија Глишића садржи све елементе и у складу  
51 је са захтевима који су прописани за завршену докторску дисертацију.  
52

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

54 Дисертација представља значајан, оригиналан допринос науци кроз неколико кључних  
55 налаза. Први пут у Србији су идентификоване специфичне линије вируса афричке куге  
56 свиња засноване на анализи нуклеотидних секвенци CVR B602L гена, укључујући две  
57 линије – једна која је идентична са референтним сојем из Грузије, и друга са  
58 специфичном мутацијом T318A, која није раније описана у Србији. Уз то, у овом  
59 истраживању је по први пут у Србији откривена и линија IGR III што представља новину  
60 у истраживању генске варијабилности вируса афричке куге свиња на територији Србије.



1 Још један значајан допринос представља и просторно-временска анализа случајева код  
2 дивљих свиња која омогућава боље разумевање динамике ширења болести у  
3 популацији дивљих свиња што је од великог значаја за ефикаснију контролу и  
4 превенцију даљег ширења вируса. Поред тога, секвенцирањем целих генома вируса  
5 идентификоване су важне мутације у кључним генима које раније нису биле детаљно  
6 описане. Ове мутације могу имати значајну улогу у разумевању вируленције и  
7 патогености вируса у Србији, а уједно пружају основу за даље истраживање генске  
8 еволуције вируса. Осим тога, утврђена ефикасност различитих примарних култура  
9 ткива за изолацију вируса, доприноси оптимизацији лабораторијских процедура за  
10 изолацију вируса. На крају, ретроспективна молекуларна епизоотиолошка анализа,  
11 показала је да су добијени резултати значајни за разумевање путева уноса вируса у  
12 земљу, што у крајњој линији доприноси изналажењу бољих стратегија контроле  
13 болести.

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

17 НЕ

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

24

25 **Dimitrije Glišić, Vesna Milićević, Dejan Krnjaić, Ivan Toplak, Radiša Prodanović, Carmina**  
26 **Gallardo, and Sonja Radojčić. (2023) "Genetic analysis reveals multiple intergenic region and**  
27 **central variable region in the African swine fever virus variants circulating in Serbia."**  
28 **Veterinary Research Communications, impact factor 1,9: M21**

29

30

31

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

**X ПРЕДЛОГ:**

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

- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

ДАТУМ

13.11.2024. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Дејан Крњић ред. проф  
Факултет ветеринарске медицине



др Радиша Продановић ван. проф  
Факултет ветеринарске медицине



др Иван Топлак ред. проф  
Ветеринарски факултет  
Универзитет у Љубљани

