

UTVRĐIVANJE KLJUČNIH ČIMBENIKA U OSMIŠLJAVANJU NOVE STRATEGIJE KONTROLE I PREVENCIJE BOLESTI PLAVOG JEZIKA

Lohman Janković, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:686103>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Ivana Lohman Janković, dr. med. vet.

**UTVRĐIVANJE KLJUČNIH ČIMBENIKA U
OSMIŠLJAVANJU NOVE STRATEGIJE
KONTROLE I PREVENCIJE BOLESTI
PLAVOG JEZIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivana Lohman Janković, dr. med. vet.

**IDENTIFICATION OF FACTORS RELEVANT
FOR DESIGN OF NOVEL BLUETONGUE
PREVENTION AND DISEASE CONTROL
STRATEGY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Ivana Lohman Janković, dr. med. vet.

**UTVRĐIVANJE KLJUČNIH ČIMBENIKA U
OSMIŠLJAVANJU NOVE STRATEGIJE
KONTROLE I PREVENCIJE BOLESTI
PLAVOG JEZIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
dr. sc. Eddy Listeš

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivana Lohman Janković, dr. med. vet.

**IDENTIFICATION OF FACTORS RELEVANT
FOR DESIGN OF NOVEL BLUETONGUE
PREVENTION AND DISEASE CONTROL
STRATEGY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Associate Professor Josipa Habuš
Eddy Listeš, PhD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, *Ivana Lohman Janković* (*ime i prezime studenta*), potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2022.

Zahvale

Zahvaljujem kolegici i mentorici izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš na stručnom i poticajnom vodstvu, korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći pri pisanju disertacije, posebice pri usmjeravanju u znanstvenom opisivanju osnovne misli o istraživanju.

Zahvaljujem kolegi i mentoru dr.sc. Eddiju Lištešu na stručnim savjetima, posebice tijekom rasprave o razlozima za provedbu određenih aktivnosti i zaključcima disertacije.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Zvonimiru Poljaku na izrazitomu strpljenju i upornosti, pomoći i nesebičnom prenošenju stručnih znanja koji su rezultirali otvaranjem nekih novih (osobnih) vidika u području epidemiologije.

Zahvaljujem kolegi Anti Vujeviću, prof. geologije i geografije na kreativnom doprinosu disertaciji.

Zahvaljujem kolegicama i kolegama u Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane na potpori i razumijevaju. Znam da nije uvijek bilo jednostavno.

Posebno zahvaljujem mojim roditeljima na bezuvjetnoj i iskrenoj podršci pruženoj tijekom cjelokupnog obrazovanja, ali i u svakodnevnim segmentima života kojima su pridonijeli prilikom izrade ove disertacije.

Svojem suprugu zahvaljujem na bezrezervnoj podršci kada se ovo činilo nemogućim, a kao kolegi na brojnim raspravama i savjetima koje smo vodili oko zajedničkih tema.

Najvažniju zahvalu upućujem Teni i Ani, vraćam vam vaše ukradeno vrijeme.

I na kraju ...

Jednom davno nepoznati pjesnik napisao je „Glava mušice na tijelu bizona, to je D.P.U.K. kraj stočnog vagona“

SAŽETAK

Bolest plavog jezika (BPJ) je vektorima prenosiva zarazna bolest preživača čija pojava uzrokuje značajne ekonomske gubitke u sektoru poljoprivredne proizvodnje. Tijekom posljednjih dvadesetak godina u Europi u nekoliko je navrata došlo je do značajnog širenja bolesti, a unatoč činjenici da su pogođene zemlje većinom usvajale standardizirane politike kontrole, primijenjeni pristup nije rezultirao zaustavljanjem cirkulacije virusa. U navedenom razdoblju zabilježeno je ponovno izbijanje BPJ na područjima gdje se isto nije pojavio duže od 10 godina, niska razina cirkulacije određenih serotipova od kojih se nekima nije uspjelo utvrditi podrijetlo, pojava novih serotipova, širenje bolesti na potpuno nova područja te manjkavost kontrole cijepljenjem uz ponovno izbijanje bolesti. Slijedom navedenog, glavni cilj ovog istraživanja bio je razvoj novog pristupa provedbi mjera kontrole i prevencije BPJ koji će biti utemeljen na dokazima i definiranju ključnih čimbenika, uzimajući u obzir sve osobitosti ove bolesti u RH. U tu je svrhu provedena sveobuhvatna analiza koja je uključivala utvrđivanje mjera učestalosti, magnitude varijabilnosti seroprevalencije, analizu čimbenika rizika, prostorno-vremensko mapiranje i analizu procijepljenosti. Utvrđeni su i razlozi neuspješnog provođenja dosadašnjih politika kontrole ove bolesti kao što su ograničenja trenutnog načina prikupljanja i pohrane podataka, te neprilagođeno, nedostatno i nepotpuno provođenje mjera kontrole i prevencije. Temeljem dobivenih rezultata definirani su ključni čimbenici u osmišljavanju nove strategije koji uključuju razvoj modela praćenja koji bi osigurali rano alarmiranje sustava i poduzimanje potrebnih mjera i prije nego se bolest unese na područje RH; kontinuiranu obnovu znanja i podizanja razine svijesti veterinarima i posjednika životinja o ranom prepoznavanju bolesti; prilagođeno usmjeravanje mjera na razinu najveće varijabilnosti – županiju; planiranje entomoloških istraživanja na način da se omogući analiza utjecaja klimatoloških i ekoloških čimbenika na pojavnost i distribuciju različitih vrsta vektora, a isto usporedi sa pojavom slučajeva u preživača; istraživanje možebitne uloge divljih preživača u održavanju infekcije i

prezimljavanju virusa. Uz prospektivno planiranje mora biti detaljno osmišljen način prikupljanja, procjene i integracije podataka te provjere postupaka tijekom samog provođenja programa. Pristup primijenjen u ovom istraživanju te dobiveni rezultati predstavljaju temelj za izradu buduće strategije kontrole i prevencije BPJ u RH, no isto bi se moglo primijeniti, kao znanstveni temelj, i za planiranje nacionalnih strategija kontrole ostalih vektorskih zaraznih bolesti životinja

Ključne riječi: bolest plavog jezika, epidemiologija, razvoj, strategija, kontrola

EXTENDED SUMMARY

Introduction

Bluetongue disease (BTD) is a vector-borne, viral disease of domestic and wild ruminants associated with considerable impact on the animal health and consequently significant economic losses in the agricultural production sector. Circulation of the BTD virus until 1998 had been localized within the tropical and sub-tropical climate zones while after this period the virus spread to the north, and by 2006 had spread to western and central Europe encompassing the belt of temperate and sub-polar climate zones. Over the past twenty years, BTD outbreaks caused by a variety of serotypes have occurred and spread several times across different regions of Europe. Although the affected countries have largely adopted standardized control measures, the approaches used has not resulted in elimination of disease. The occurrence of BTD during this period included unexpected epidemics in areas where the disease had never been confirmed before, low level circulation of certain serotypes, some of which have an unclear origin, incursions of new serotypes, vaccine incidents and disease reoccurrence. Implementation of appropriate surveillance, control and preventive measures are further complicated by the incomplete understanding of the ecology of the vectors, viral transmission dynamics and maintenance in a given area.

In the Balkan Peninsula region, where BTD had not occurred for more than 10 years, an unexpected epidemic of serotype 4 occurred in 2014. The first detection of this serotype in the region was followed by rapid spread to 11 south-eastern European countries over a very short time period. Although many studies have investigated BTD in Europe, no nationwide study on the prevalence of BTD serotype 4, influence of climatological factors, vectors and overwintering mechanism or efficiency of applied vaccination programs from Croatia have been carried out.

In 2015, the Croatian Ministry of Agriculture implemented a comprehensive mass vaccination campaign against BTB for all ruminants in Croatia. Vaccination campaign followed the recommendations of the EFSA 2017 *Scientific report on Bluetongue: control, surveillance and safe movement of animals* until the end of implementation in 2019. Despite implemented measures, only 18 months upon last vaccination campaign BTB re-occurred in 2020 when serotype 4 was re-confirmed in sentinel animals in Istarska, Dubrovačko-neretvanska and Požeško-slavonska counties.

Objectives

The recent BTB outbreaks in Croatia suggest that the implementation of measures cannot be generalized. Planning must take into account the specific conditions of the area, such as population density and demographics, climatic factors, vector ecology and availability of administrative resources, to ensure that a strategy for BTB disease control and potential eradication is based on a *case-by-case* approach.

In a view of the above, the main objective of this research was to develop a new approach to the implementation of BTB control and prevention measures that is evidence-based and includes forward strategy planning on the basis of relevant data, taking into account all the characteristics of the disease epidemiology in Croatia. For that purpose, certain specific objectives of the research included calculation of disease frequency measures, assessment of the magnitude of seroprevalence variability, analysis of risk factors, spatial-temporal mapping and evaluation of the impact of vaccination programs.

Material and methods

This research covered the areas of all Croatian counties where measures for the control and monitoring of BTB were implemented in the period 2014 to 2019. In order to do a comprehensive epidemiological analysis, data on laboratory testing, dynamics of ruminant

population, movement of live animals, clinical signs detected, vaccination of cattle, sheep and goats, entomological studies of *Culicoides* species and climatic factors were collected. All data were analysed after being separated into a clinical phase that lasted from 27 October 2014 till 01 July 2015 and a phase of active control from 15 August 2015 till 31 December 2019.

Descriptive statistics included frequency tables and epidemiological curves. Hierarchical logistic regression with binary outcome of serological testing in sheep was used to establish relative variability in serological positive response at the county, municipality and herd level, where the latter administrative and organizational units were used as random effects in a hierarchical logistic regression model. Risk factors for the number of BTD cases in the county over time during the clinical phase were determined through negative binomial regression with county as a random effect on intercept. Univariable analysis was followed by building the final multivariable regression model. During the phase of active control, likelihood of detecting a positive sentinel animal was determined by fitting the logistic regression model with county as a random effect on the intercept. The main exposures of interest were the percentage of vaccinated cattle, sheep, goats and ruminants in general. Regression models containing individual exposures of interest, and adjusted for the fixed effect of year, as well as random effect of county were used to inform development of the final multivariable models.

Results

Analysis of the ruminant population dynamics from 2014 to 2019 showed that mixed-type herds with more than one ruminant species predominated in Croatia and that more than 83% of herds kept less than 50 animals. Bovine population is continuously declining while sheep and goats are slightly increasing. In the territory of Croatia, two serotypes of the BTD virus were circulating; serotype 4 circulated throughout the area of the entire country whereas serotype 1 did not spread beyond the boundaries of the location of the island of Lastovo.

During the clinical phase of epidemic, the morbidity and mortality in affected herds were 19.33% and 3.31%, respectively. Severe clinical signs described in the literature were not be observed and disease had a mild course. In the four southern counties where clinical disease was observed during clinical phase, herd-level seroprevalence confirmed by ELISA in the study population was 89.83% and animal-level seroprevalence was 29.38%. The overall herd-level prevalence in the study population confirmed by RT-PCR was 68.08% with the animal-level prevalence 23.66%. All animals laboratory tested due to clinical suspicion were positive by RT-PCR. The highest number of seropositive herds was located near the first confirmed case in the affected area. Results of the variance component analysis which included three hierarchical levels county, municipality and herd revealed that the highest level of variability was detected at county level, regardless of the type of model and the approach used. This suggested that implementation of disease control and prevention measures at the county level would indeed be the most effective way to implement disease control measures. Univariable analysis of climatological factors detected a statistically significant association with the number of new cases in the county only for temperature. The increase in mean daily temperature to 18° C increases the number of cases in the county by 4.18 times (95% CI 1,18 -14,73). For precipitation, humidity and wind speed no statistically significant association was found with the occurrence and spread of BTB.

Seropositive sentinel animals confirmed by ELISA were detected during the entire phase of active control of epidemic, with the highest animal-level seroprevalence (23%) in 2015 and the lowest (9%) in 2019. At the species level, the highest seroprevalence was found in cattle (10.62%), followed by sheep (5.64%) and then goats (0.13%) which actually corresponded to the number of sentinels used per ruminant species. Overall 5.06% sentinel samples tested by RT-PCR were positive with the highest prevalence during October, a tendency to decrease in November and December and no recorded BTB positive cases from February to August. The

highest overall prevalence (15.53%) was in 2016, and the lowest in 2017 (0.52%), while in 2018 and 2019 BTB was not confirmed by RT-PCR. Such findings are directly related to the results of the vaccination. Cumulative herd vaccination coverage was 88.93% and 84.55% at the animal level. Statistical analysis of the vaccination impact has shown that as the percentage of vaccinated animals increase, the probability of detecting seropositive sentinel animals decreases. This type of association was found to be statistically significant for all variables (year, animals and herds of cattle and goats) except for the percentage of vaccinated sheep at herd and animal level, which was an unexpected finding.

The dominant presence of palearctic *Culicoides* species from *Obsoletus* and *Pulicaris* complexes was confirmed, as well as the complete absence of *C. imicola*. Circulation of vectors in Croatia has two peaks, the first (larger) during May-June and the second (smaller) during October. A smaller number of vectors was isolated during December and the period January-March which could indicate that the specified period could be considered as a vector-free period.

Discussion and Conclusions

The last introduction of BTB in Croatia is likely a consequence of passive transport of infected vectors by wind. In the overall sample morbidity and mortality were low and the circulation of serotypes detected was not evenly distributed throughout the country. The analysis of variance at three hierarchical administrative levels (county, municipality, herd) in all models indicated that the highest proportion of total variance resided at the county level. Using univariable and multivariable regression models among all the analysed climatological factors that may affect BTB incidence, statistically significant association was found only for temperature. Precipitation, relative humidity, and wind speed could not be identified as statistically significant factors. A comparison of the vaccination results and the overall prevalence suggested that vaccination led to a decrease in prevalence and that the percentage of

seropositive herds declined, but without complete elimination of infection. Evidence of seropositive sentinel animals during all five years of vaccination clearly indicated that vaccination coverage less than 90% of total population did not ensure complete elimination of the virus and it continued to circulate at low levels throughout the whole period. The reasons for the lack in the implementation of the previous policies for the control of BTB, such as limited data collection and storage as well as inadequate, insufficient and incomplete implementation of control and prevention measures, were identified.

Based on the obtained results, key factors in design of a new strategy were defined and the most significant includes: development of disease monitoring models that would ensure early response of the system and implementation of necessary measures before the disease is introduced into the territory of Croatia; continuous renewal of knowledge and raising the level of awareness among veterinarians and animal owners about early detection of the disease; adjusted targeting of measures to the level of the highest variability - county; planning of the entomological research to enable the analysis of the influence of climatological and ecological factors on the occurrence and distribution of different types of vectors and to compare the same with the occurrence of cases in ruminants; research of possible role of wild ruminants in maintaining infection and overwintering.

In addition to prospective planning, a detailed method for data collection, evaluation and integration as well as verification of procedures during the implementation of the program must be developed. The approach applied in this research and the obtained results represent the basis for the development of future strategy for control and prevention of BTB in Croatia, and the same could be applied, as a scientific base, for planning the national control strategies of other vector borne animal diseases.

Key words: bluetongue, epidemiology, vectors, vaccination, strategy, key factors

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Povijest bolesti plavog jezika	5
2.2. Etiologija	6
2.2.1. Serotipovi, topotipovi i nukleotipovi	8
2.2.2. Tenacitet	10
2.3. Globalna distribucija i dinamika širenja virusa BPJ.....	10
2.4. Ekonomski značaj.....	12
2.5. Epizootiologija.....	13
2.5.1. Način širenja.....	14
2.5.1.1. Širenje vektorima.....	14
2.5.1.1.1. Biologija i ekologija komarčića roda <i>Culicoides</i>	14
2.5.1.1.2. Komarčići roda <i>Culicoides</i> kao biološki vektori BPJ.....	17
2.5.1.2. Atipični načini širenja BPJ	20
2.5.1.3. Sezonalnost i prezimljavanje virusa	22
2.5.2. Vrste životinja prijemljive na BPJ	23
2.5.3. Pobol i pomor	24
2.6. Patogeneza bolesti plavog jezika	25
2.7. Klinička slika.....	28
2.7.1. Bolest plavog jezika u ovaca	29
2.7.2. Bolest plavog jezika u goveda i koza	33
2.7.3. Bolest plavog jezika u drugih vrsta životinja	34
2.8. Patološke promjene.....	35
2.9. Dijagnostika.....	36
2.9.1. Dokaz uzročnika BPJ	38
2.9.1.1. Izdvajanje virusa.....	38
2.9.1.2. Identifikacija virusa	38
2.9.1.2.1. Određivanje serološke skupine	39
2.9.1.2.2. Određivanje serotipa.....	39
2.9.1.3. Molekularne metode	40
2.9.1.3.1. Dokaz nukleinske kiseline	40
2.9.1.3.2. Sekvencioniranje nukleinskih kiselina	41
2.9.2. Dokaz specifičnih protutijela	41
2.10. Diferencijalna dijagnostika	43

2.11.	Liječenje, kontrola i preventivne mjere	43
2.11.1.	Liječenje životinja oboljelih od bolesti plavog jezika.....	43
2.11.2.	Preventivne mjere na gospodarstvima.....	44
2.11.3.	Cijepljenje protiv bolesti plavog jezika.....	47
2.12.	Bolest plavog jezika u Republici Hrvatskoj.....	48
3.	OBRAZLOŽENJE TEME	62
4.	MATERIJAL I METODE	65
4.1.	Geografsko područje obuhvaćeno istraživanjem.....	65
4.2.	Vremensko razdoblje obuhvaćeno istraživanjem	66
4.3.	Izvori podataka korištenih u istraživanju.....	67
4.3.1.	Podatci o brojnom stanju životinja.....	67
4.3.2.	Podatci o laboratorijskim pretraživanjima	67
4.3.3.	Podatci o kliničkim znakovima bolesti	69
4.3.4.	Podatci o premještanju živih životinja	70
4.3.5.	Podatci o entomološkom istraživanju	70
4.3.6.	Podatci o klimatskim elementima	71
4.3.7.	Podatci o cijepljenim životinjama	71
4.4.	Definicija slučaja BPJ, stada i kriteriji za uključivanje i isključivanje podataka	72
4.4.1.	Klinička faza epizootije (od 27. listopada 2014. do 1. srpnja 2015. godine).....	72
4.4.2.	Faza aktivne kontrole epizootije (od 15. srpnja 2015. do 31. prosinca 2019. godine) 76	
4.5.	Obrada podataka	80
4.5.1.	Razdoblje kliničke faze epizootije	80
4.5.2.	Razdoblje faze aktivne kontrole epizootije	82
5.	REZULTATI.....	84
5.1.	Brojno stanje životinja, analiza distribucije stada i životinja	84
5.1.1.	Analiza brojnog stanja i distribucije stada i životinja tijekom kliničke faze epizootije (2014. godina)	84
5.1.2.	Analiza brojnog stanja životinja te distribucije stada i životinja tijekom faze aktivne kontrole epizootije (2015. - 2019. godine).....	85
5.2.	Analiza prijavljenih kliničkih znakova BPJ	96
5.3.	Deskriptivna statistika za razdoblje kliničke faze epizootije.....	98
5.3.1.	Vremenska i prostorna distribucija mjera učestalosti (seroprevalencije, incidencije, kumulativne incidencije te stvarne prevalencije)	98
5.3.2.	Klimatološki čimbenici	111
5.3.3.	Podatci o premještanjima životinja	120

5.3.4. Entomološko istraživanje	121
5.4. Deskriptivna statistika za razdoblje faze aktivne kontrole epizootije	121
5.4.1. Vremenska i prostorna distribucija mjera učestalosti (seroprevalencije, incidencije, kumulativne incidencije te stvarne prevalencije)	121
5.4.2. Cijepljenje	136
5.4.3. Entomološko istraživanje	150
6. RASPRAVA	159
7. ZAKLJUČCI.....	178
8. PRILOZI	179
8.1. Popis slika.....	179
8.2. Popis tablica.....	182
8.3. Popis kratica	184
9. LITERATURA	186
10. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA.....	203

1. UVOD

Bolest plavog jezika (BPJ) je nekontagiozna, vektorska bolest domaćih i divljih preživača čiji su biološki vektori različite vrste komarčića roda *Culicoides*. BPJ uzrokuje virus iz roda *Orbivirus*, porodica *Reoviridae*. Virusna čestica sastoji se od deset segmenata dvolančane RNK koji kodiraju sintezu sedam strukturnih (VP1-VP7) i četiri ne strukturna (N1-N4) proteina (BELHOUCHE i sur., 2011.). Obavijena je dvoslojnom kapsidom, a strukturni protein VP2 glavna je komponenta vanjske kapside i dominantni antigen koji inducira tvorbu specifičnih neutralizacijskih protutijela i determinira serotip (MERTENS i sur., 1987.). Danas, na temelju antigenih obilježja razlikujemo 28 serotipova virusa BPJ (BUMBAROV i sur., 2019.). Opisano je i dodatnih osam potencijalnih serotipova kojima pripadaju atipični sojevi koje se ne može serotipizirati konvencionalnim metodama. Virus se u slobodna područja unosi introdukcijom zaraženih životinja ili vektorima nošenim vjetrom. Iako se prijenos virusa ubodom zaraženog komarčića smatra dominantnim načinom prijenosa, postoje dokazi da se neki serotipovi BPJ mogu prenositi i horizontalno, transplacentarno i/ili kolostrumom (MENZIES i sur., 2008.; MAYO i sur., 2010.; VAN DER SLUIJS i sur., 2011.). Značaj ovih atipičnih načina prijenosa u ekologiji BPJ još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Dodatna istraživanja potrebna su i kako bi se utvrdili mehanizmi prezimljavanja virusa. Naime, ranije se zbog sezonalnih osobina vektora smatralo da je prijenos BPJ moguć samo za toplijeg doba godine, no izbijanja BPJ na području sjeverne Europe i Kanade upućuju na mogućnost preživljavanja virusa tijekom zimskih mjeseci (MAYO i sur., 2014.). Produljene viremije u goveda ne traju dovoljno dugo, a trenutno nije dokazan ni transovarijski prijenos virusa na sljedeće generacije vektora (EFSA, 2017.). Rezultati dostupnih studija ukazuju da divlji preživači vrlo vjerojatno imaju određenu ulogu u cirkulaciji virusa i održavanju infekcije BPJ u određenom području, posebice ako je

gustoća kompetitivne vrste domaćih preživača niska. Ipak, njihova uloga u prezimljavanju virusa još uvijek nije potvrđena (RUIZ-FONS i sur., 2014.; EFSA, 2017.). Epizootologiju ove bolesti pa time i određivanje mjera nadzora, kontrole i prevencije dodatno otežava i nepotpuno razumijevanje ekologije njenih vektora, dinamike kretanja i održavanja na određenom području. Na području Europe je do 2014. godine potvrđena cirkulacija serotipova 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 16 i 25 virusa BPJ (ANONYMOUS, 2020.). Izniman epizootiološki značaj predstavlja izbijanje BPJ serotipa 8 u zapadnoj i sjevernoj Europi tijekom 2006.-2008. godine kad zbog neuobičajeno visoke virulencije soja koja je uzrokovala bolest u svih domaćih preživača dolazi do vrlo velikih ekonomskih gubitaka (SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.). Ova epizootija uvelike je utjecala na usmjeravanje mjera kontrole BPJ u EU poticanjem kampanja masovnog cijepljenja (WILLSON i MELLOR, 2009.). U Republici Hrvatskoj BPJ prvi je put potvrđena 2001. kad je na području Dubrovačko-neretvanske županije potvrđena cirkulacija serotipa 9. Bolest je u RH unesena iz Crne Gore, a *C. obsoletus* i *C. scoticus* su detektirani kao glavni vektori (LISTEŠ i sur., 2011.). Ponovno izbijanje BPJ zabilježeno je 2004. godine potvrdom serotipa 16 koji je zaraženim vektorima vjetrom iz Italije unesen ponovno na područje Dubrovačko-neretvanske županije (LISTEŠ i sur., 2009.). Pravodobnim reakcijama RH uspijeva suzbiti navedene epizootije. Na području Balkanskog poluotoka na kojim se BPJ nije pojavila više od 10 godina, 2014. godine dolazi do neočekivane epidemije serotipa 4 (EFSA, 2017.). Prisustvo serotipa 4 prvo prijavljuje Turska, nakon čega u svega nekoliko mjeseci slijede prijave iz Grčke, Bugarske, Albanije, BIH, Makedonije, Srbije, Crne Gore, Rumunjske, Hrvatske i Mađarske (ANONYMOUS, 2020.). Serotip 4 prvi put je potvrđen u RH u listopadu 2014. godine u Dubrovačko-neretvanskoj županiji, a do veljače 2015. godine cirkulacija ovog serotipa dokazana je i u Splitsko-dalmatinskoj, Šibensko-kninskoj, Zadarskoj i Vukovarsko-srijemskoj županiji. Na otoku Lastovo dokazan je i izdvojen slučaj infekcije serotipom 1. Zbog naglog širenja bolesti, epidemiološke situacije u susjednim zemljama te indirektnih šteta

nastalih ograničenjima u prometu životinja donesena je odluka o obveznom cijepljenju svih goveda, ovaca i koza koje se provodilo u kontinuitetu od 2015. do 2019. godine primjenom istog cjepiva s inaktiviranim virusom BPJ serotip 4, u rokovima i razdoblju godine kojim se osiguralo stjecanje imuniteta populacije prije očekivane aktivnosti vektora. U kolovozu 2015. godine započela je i provedba programa nadziranja BPJ s ciljem praćenja cirkulacije serotipa 4 u zemlji i otkrivanjem ranog unosa i/ili daljnjeg širenja bilo kojeg drugog serotipa BPJ, koji je temeljen na nasumično odabranim sentinel životinjama. Unatoč svim provedenim mjerama, vrlo brzo nakon prestanka cijepljenja, već u listopadu 2020. godine BPJ serotip 4 ponovno je potvrđen u RH na području Istarske županije. Do kraja 2020. godine izbijanje BPJ potvrđeno je u Istarskoj, Dubrovačko-neretvanskoj i Požeško-slavonskoj županiji. Uvažavajući čimbenike koji mogu utjecati na širenje i vremensko trajanje bolesti Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je 2017. godine izdala znanstveno mišljenje o najnovijim saznanjima vezanim za epidemiološke značajke ove bolesti, posebice načine prijenosa iste. Temeljem matematičkog modela, izrađena je i procjena najprikladnijeg vremena trajanja kampanje cijepljenja sa svrhom postizanja statusa zemlje ili regije slobodne od BPJ. Provedba kampanje masovnog cijepljenja u trajanju od najmanje 5 uzastopnih godina s 95% razinom procijepljenosti populacije, praćena programom nadziranja kojim se omogućava otkrivanje niske razine prevalencije virusa (manje od 1%) izdvojena je kao jedina učinkovita mjera koja dovodi do iskorjenjivanja BPJ. Zaključeno je ipak da pristup provedbi mjera ne može biti generaliziran, već je u planiranju neophodno uzeti u obzir i specifične uvjete (gustoću populacije, klimatske čimbenike) te strategiju temeljiti na pristupu „od slučaja do slučaja“.

Slijedom navedenog za glavni cilj ove disertacije postavljen je razvoj novog pristupa mjerama kontrole i prevencije BPJ koji će biti utemeljen na definiranju relevantnih podataka i osobitostima ove bolesti u RH. U tu svrhu dodatno su disertacijom određeni i specifični ciljevi

istraživanja kojima se utvrdilo te prostorno-vremenski mapiralo mjere učestalosti, magnitude varijabilnosti seroprevalencije, analiziralo čimbenike rizika i utjecaj cijepljenja.

Kroz isto su utvrđena ograničenja trenutnog načina prikupljanja i pohrane podataka što predstavlja osnovni korak za unaprjeđenje epidemioloških analiza i kasnije kreiranje mjera kontrole bolesti. Stoga će očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja biti upravo u razvoju novog pristupa provedbi mjera kontrole i prevencije BPJ koji će biti utemeljen na rezultatima epidemiološke analize, a uključivat će prospektivno planiranje strategije temeljeno na definiranju ključnih podataka, njihovom prikupljanju, procjeni i integriranju, provjeri postupka kako bi se osiguralo usklađivanje s planom i vodećim načelima uzimajući u obzir sve osobitosti ove bolesti u RH. Osim toga ovako razvijen pristup naći će primjenu, kao znanstveni temelj, i za planiranje nacionalnih strategija kontrole ostalih vektorskih zaraznih bolesti životinja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Povijest bolesti plavog jezika

Bolest plavog jezika (BPJ) prvi put opisana je 1880. godine. Iako je vjerojatno već tada bila endemična u divljih preživača i autohtonih afričkih pasmina ovaca, prve značajnije posljedice zabilježene su nakon uvoza visoko osjetljivih ovaca Merino pasmine krajem 18. stoljeća iz Nizozemske u Cape Province u Južnoj Africi. U početku je bolest nosila naziv „*malarijska kataralna groznica*“ zbog pogrešnog povezivanja s uzročnikom malarije te uvjerenja da je bolest uzrokovana intraeritrocitnim parazitom. Opisan je i vjerojatni prijenos bolesti kako tada navode „nekom vrstom insekata koji grizu životinje“ (HUTCHEON, 1881., 1902.). Radi karakteristične cijanoze jezika uočene u oboljelih ovaca kao specifičnog kliničkog znaka bolesti je 1905. i promijenjen naziv u bolest plavog jezika (SPREULL, 1905.). Tijekom tog prvog zabilježenog istraživanja detaljno su opisani klinički znakovi i patoanatomske promjene. Dokazano da BPJ u autohtonih afričkih pasmina ovaca izaziva blagu bolest s jedva zamjetnom kliničkom slikom, a u uvezenih ovaca Merino pasmine visok pobol s izraženom kliničkom slikom. Također, eksperimentalno je utvrđeno da koze i goveda obolijevaju znatno blažim oblikom bolesti. Theiler 1905. godine dokazuje propusnost uzročnika kroz filter što ukazuje na činjenicu da je uzročnik bolesti virus (THEILER, 1906.). Prvo atenuirano cjepivo protiv BPJ spravljeno od jednog virulentnog soja BPJ, danas poznatog kao serotip 4, oslabljenog serijskim pasażama na ovcama, Theiler je razvio 1906. godine (THEILER, 1908.; COETZEE i sur., 2012.), a isto je u Južnoj Africi primjenjivano gotovo 40 godina. Pretpostavku da bi pojedine vrste komarčića roda *Culicoides* mogle imati ulogu u prijenosu BPJ potvrđuje eksperimentalna studija 1944. godine (DU TOIT, 1944.) tijekom koje je dokazano da ovi komarčići hranjenjem na zaraženim ovcama bolest mogu prenijeti na zdrave ovce nakon samo nekoliko dana inkubacije virusa u insektima. *C. imicola* (raniji naziv *C. pallidipennis*) tad je prvi put

identificiran je kao mogući prijenosnik BPJ u ovaca (DU TOIT, 1944.). Neitz 1948. godine provodi istraživanja o različitim serotipovima BPJ u prirodi i mogućnostima križne zaštite od infekcije u ovaca te potvrđuje da su ovce zaražene određenim sojem razvile doživotni zaštitni imunitet protiv ponovne infekcije istim sojem, ali samo djelomičan ili nikakav imunitet od infekcije s drugim sojevima (NEITZ, 1948.). Rezultati ove studije potakli su daljnja istraživanja i serotipizaciju terenskih izolata virusa BPJ što je bio ključni korak za razvoj budućih cjepiva. Šezdesetih godina razvijen je neutralizacijski test kojim su 22 terenska izolata s područja Južne Afrike tipizirana u 12 različitih serotipova BPJ (HOWELL, 1960.).

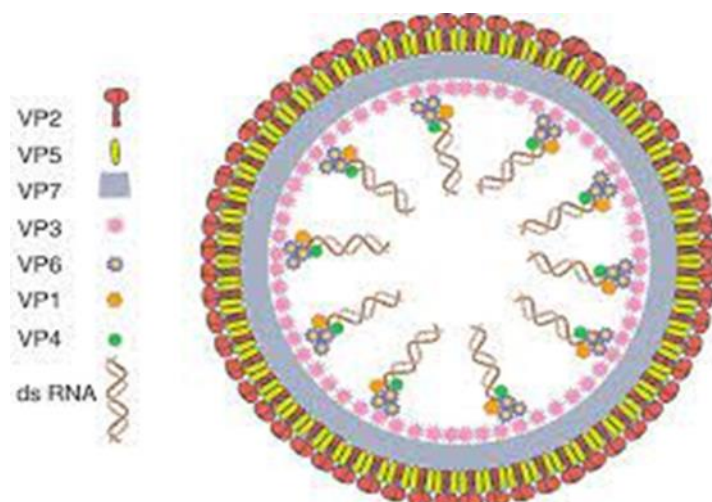
Izvan granica afričkog kontinenta bolest je prvi put zabilježena 1943. godine kada je BPJ serotipa 3 potvrđena u ovaca na Cipru (GAMBLES, 1949.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.) te u Izraelu (GAMBELES, 1949.; SHIMSHONY, 2004.). Klinički znakovi BPJ u ovaca na američkom kontinentu prvi puta su opisani 1948. godine u Texasu (HARDY i PRICE, 1952.), a 1977. godine BPJ je potvrđena u goveda u Australiji (ST GEORGE i sur., 1980.). Širenje BPJ te pojava novih serotipova slijede i na drugim kontinentima, no znakovito je da izbijanja nisu prijavljivana izvan pojasa tropske i sub-tropske klimatske zone. Promjene u pojavnosti bolesti te širenje van poznatog područja kretanja BPJ bilježe se intenzivnije u posljednjih dvadesetak godina, što se povezuje s složenim mehanizama prijenosa bolesti i preživljavanja virusa u okolišu.

2.2. Etiologija

Prema klasifikaciji Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (ICTV), virus bolesti plavog jezika pripada porodici *Reoviridae*, rodu *Orbivirus* u koji je do danas svrstano ukupno 22 različite vrste (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021.).

Virus BPJ kuglastog je oblika bez ovojnice, promjera 80-90 nm. Kapsida ima oblik ikozaedra, a građena od tri sloja proteina (MERTENS i DIPROSE, 2004.). Genom virusa čini dvolančana RNK podijeljena na deset segmenata koji kodiraju sintezu 11 proteina; sedam strukturnih

(VP1-VP7) i četiri nestrukturna (NS1-NS3, NS3A) proteina (BELHOUCHE i sur., 2011.). Svaki segment RNK kodira za jedan protein virusa, osim gena S10 koji kodira sintezu dva različita proteina; NS3 i NS3A (ROY, 1989.). Vanjski sloj kapside građen je od dva proteina VP2 i VP5, koji su odgovorni za prihvaćanje i prodiranje virusa u stanice sisavaca tijekom početne faze infekcije (HASSAN i ROY, 1999.). Protein VP2 odgovoran je za prihvaćanje za receptore i hemaglutinaciju dok VP5 ima značajnu ulogu u penetraciji virusnih čestica iz endosoma u citoplazmu. Oba proteina razgrađuju se nakon ulaska u stanicu nakon čega virus postaje transkripcijski aktivan (HASSAN i sur., 2001.). Smatra se da je protein VP2 glavna komponenta vanjske kapside i dominantni antigen koji inducira tvorbu specifičnih neutralizacijskih protutijela i determinira serotip (MERTENS i sur., 1987.). Unutarnji sloj kapside građen je od velikih proteina VP7 i VP3 i manjih VP1, VP4 i VP6. Protein VP7 nalazi se na površini unutarnjeg sloja kapside i odgovoran je za infekciju stanica insekata (TAN i sur., 2001.). VP7 je i glavna odrednica specifičnosti serološke skupine i mjesto epitopa u kompetitivnom imunoenzimnom testu (engl. competitive enzyme-linked immunosorbent assay -c-ELISA) za otkrivanje antitijela virusa BPJ (MERTENS i sur., 2005.; ANONYMOUS, 2021.). VP3 i VP7 imaju značajnu ulogu u strukturnom integritetu jezgre virusa. Oni čine grupno specifične antigene determinante definirajući nekoliko različitih filogenetskih grupa. Mali proteini VP1, VP4 i VP6 vjerojatno sudjeluju u transkripciji i replikaciji genoma virusa (SCHWARTZ-CORNIL i sur., 2008.). (Slika 1.)



Slika 1. Shema strukturnih proteina i RNA segmenata (Izvor: SCHWARTZ-CORNIL i sur., 2008.)

Nestrukturni proteini utvrđeni su samo u stanicama inficiranim virusom BPJ (VAN DIJK i HUISMANS, 1988.; SAMINATHAN i sur. 2020.) i smatra se da imaju ulogu u raznim fazama replikacije virusa (FILLMORE i sur., 2002.) te sazrijevanju i oslobađanju novih virusnih čestica iz inficirane stanice (SAMINATHAN i sur. 2020.). Proteini NS1 i NS2 najzastupljeniji su u inficiranim stanicama domaćina, dok se NS3 i NS3A u većim količinama sintetiziraju u stanicama insekata što upućuje na njihovu ulogu u replikaciji i diseminaciji unutar populacije vektora (GUIRAKHOO i sur., 1995.; SCHWARTZ-CORNIL i sur., 2008.).

2.2.1. Serotipovi, topotipovi i nukleotipovi

Danas, na temelju antigenih obilježja određenih razlikama VP2 proteina razlikujemo 28 serotipova virusa BPJ (BUMBAROV i sur., 2020.). Opisano je i dodatnih osam potencijalnih serotipova kojima pripadaju atipični sojevi, koje se ne može serotipizirati konvencionalnim metodama.

Dodatna genetska varijacija zamijećena je i unutar serotipova. Filogenetske analize pokazale su da varijacije genskih slijedova u različitim segmentima serotipova virusa BPJ odražavaju zemljopisno podrijetlo svakog izolata (topotipovi) (MELLOR i sur., 2008.). Većinu sojeva

virusa BPJ tako možemo svrstati u skupinu istočnih ili zapadnih topotipova (MAAN i sur., 2007., 2009., 2010.; MERTENS i sur., 2007.). Virusi koji pripadaju zapadnoj skupini topotipova cirkuliraju na području Afrike, Europe i Amerike, a iz istočne skupine topotipova na području Azije, Indonezije i Australije, Srednjeg Istoka i dijelu Europe u području Mediterana. (MAAN i sur., 2009.; RAO i sur., 2017.).

Različite sojeve (uključujući različite serotipove i topotipe) unutar roda *Orbivirus* karakterizira mogućnost ponovnog preslagivanja, a broj mogućih preslagivanja virusa BPJ povećava se s brojem cirkulirajućih serotipova (SAEGERMAN i sur., 2008.). Prisutnost istih serotipova unutar različitih regija upućuje na njihovo zajedničko podrijetlo. Unosom u nova područja, uzastopnim replikacijama virusa u kralježnjacima i beskralježnjacima, postupno mutiraju te se prilagođavaju lokalnim ekosustavima i populacijama vektora. Proces mutacije te preslagivanje dijela genoma doprinijeli su divergenciji virusa BPJ u topotipe (NOMIKOU i sur., 2015b.; RAO i sur., 2017.).

Obzirom da unutar skupine istočnih i zapadnih topotipova možemo razlikovati više skupina pretpostavlja se da i drugi čimbenici osim zemljopisne odvojenosti i antigenog skretanja imaju utjecaj na evoluciju različitih serotipova. Kako se uglavnom radi o razlikama u segmentima 7 i 10 (Seg-7; Seg-10) koji imaju značajnu ulogu u infekciji i izlasku iz stanica insekata, moglo bi se raditi o prilagodbi na različite vrste/populacije vektora (TAN i sur., 2001.; CELMA i ROY, 2009.). Pritom, uočena je i jasna povezanost između unakrižne serološke reaktivnosti koja se javlja između pojedinih serotipova i sličnosti u sekvencama nukleotida u segmentima 2 i 6. Za takve skupine, srodnih serotipova kaže se da pripadaju istom nukleotipu.

Serotipove karakterizira različit stupanj virulencije. Primjerice serotip 8 smatra se izuzetno virulentnim zbog značajnih kliničkih oboljenja uzrokovanih u populaciji ovaca i goveda u sjevernoj Europi. Ipak, isti serotip u Italiji nekoliko godina kasnije nije uzrokovao pojavu kliničkih znakova u prijemljivih životinja (CAPORALE i sur., 2014.).

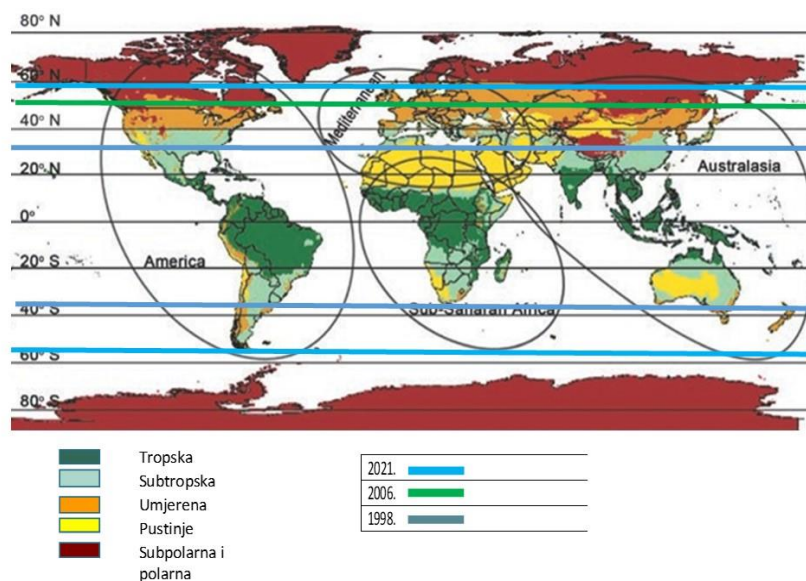
2.2.2. Tenacitet

Virus BPJ stabilan je u prisutnosti proteina te u inficiranim tkivima ili krvi pohranjen na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ ili zamrznut na temperaturi od -70°C može preživjeti više godina (PARSONSON i MCCOLL, 1995.; PUGGIONI i sur., 2006.).

Temperatura od 50°C inaktivira ga za 3 sata, a na 60°C inaktiviran je za 15 minuta. Relativno je otporan na ultraljubičasta i gama zračenja. Stabilan je na pH vrijednosti od 6.5 do 8.0 i relativno otporan na otapala za masti kao što su eter i kloroform. Inaktiviraju ga sredstva na bazi β -propiolaktona, jodofora i fenolnih spojeva (ANONYMOUS, 2021.).

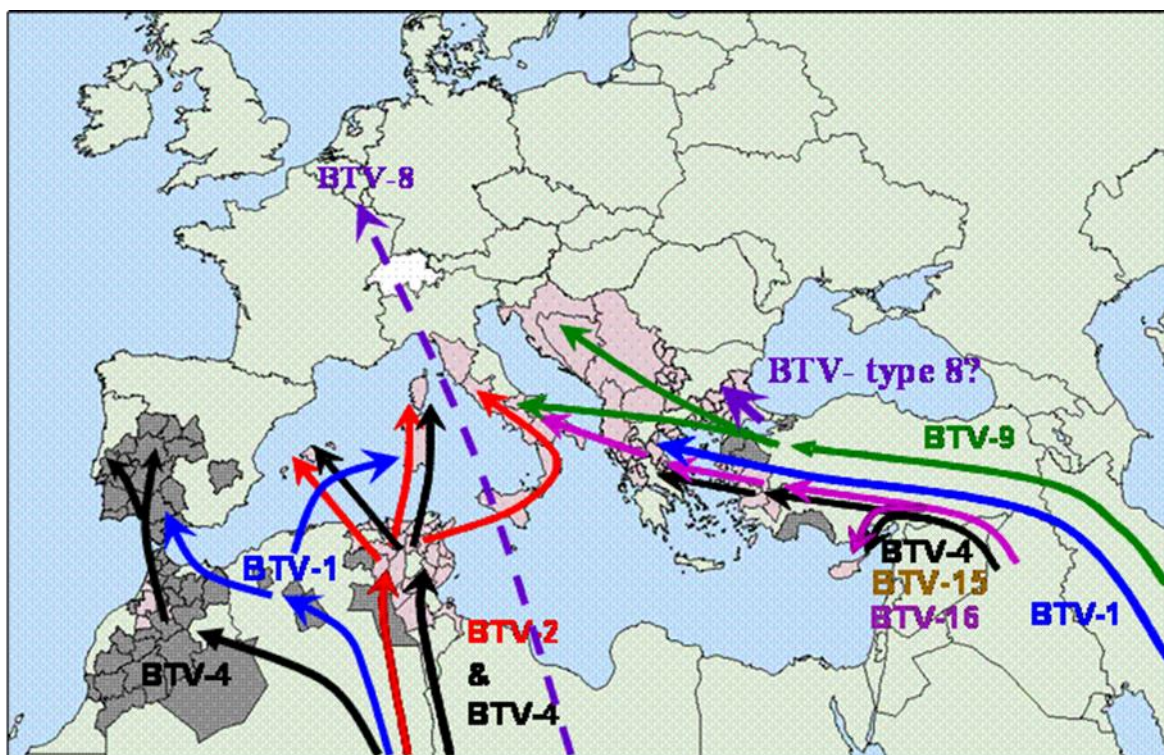
2.3. Globalna distribucija i dinamika širenja virusa BPJ

Do 1998. godine cirkulacija virusa BPJ kretala se u području između 35° južne i 40° sjeverne geografske širine, unutar pojasa tropske i sub-tropske klimatske zone. Nakon tog razdoblja dolazi do jače ekspanzije BPJ prema sjeveru te se do 2006. godine bolest proširila područjem zapadne i srednje Europe. Danas se BPJ javlja u područjima između 60° južne i 55° sjeverne geografske širine, obuhvaćajući pojas i umjerene i sub-polarne klimatske zone (Slika 2).



Slika 2. Geografska distribucija BPJ u razdoblju 1998. – 2021. prema klimatskim zonama pripremljenim uporabom FAO GeoNetwork (Izvor: PAVULURI i sur., 2017.)

Na području Europe do 1998. godine zabilježene samo dvije značajnije epizootije BPJ i to 1956. godine na Iberijskom poluotoku s visokim mortalitetom u ovaca (MANSO-RIBEIRO i sur., 1957.) i ponovno tek 1979. godine na Egejskim otocima u Grčkoj (VASALOS, 1980.). Tijekom tog razdoblja unos novih serotipova virusa BPJ u Europu događao se vrlo rijetko i uglavnom se bolest pojavljivala u dijelu zemalja sredozemnog bazena koji obuhvaća područje Španjolske, Portugala, Cipra i Grčke (MELLOR i WITTMANN, 2002.). Promjene u dinamici i kretanju bolesti uočavaju se poslije 1998. godine, nakon potvrde BPJ uzrokovane serotipom 9 na nekoliko Grčkih otoka, odakle se širenje BPJ nastavilo sve do područja Balkanskog poluotoka (SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011., ANONYMOUS 2021.). U svega nekoliko godina BPJ se proširila sjevernije i zapadnije od uobičajenih granica pojavnosti te je izbijanja bolesti redovito pratila i pojava novih serotipova (WILSON I MELLOR, 2009.). Genetska analiza virusa BPJ izoliranih u Europi pokazala je da je u regiju uneseno deset novih serotipova virusa (1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 16, 25 i 27) (ANONYMOUS, 2021.) te da su uvriježena tri različita puta unosa BPJ. S istoka preko Turske u Cipar, Grčku i Bugarsku, iz Sjeverne Afrike (Tunisa) u Italiju, iz Maroka preko Gibraltara u južnu Španjolsku i Portugal. Put unosa serotipa 8 u sjevernu Europu do sada nije razjašnjen (WILSON i MELLOR, 2009.). (Slika 3.).



Slika 3. Put unosa raznih serotipova virusa BPJ u Europu (Izvor: REOVIRIDAE.ORG, 2021.)

Danas je BPJ proširena gotovo po svim kontinentima (MELLOR, 1990.) te se smatra da je jedino Antartika slobodna od infekcije (MACLACHLAN i sur., 2009.). Stoga je i opravdano karakterizirana kao emergentna prekogranična (transkontinentalna) bolest (MACLACHLAN, 2011.; MACLACHLAN i sur., 2015.; ALKHAMIS i sur., 2020.).

2.4. Ekonomski značaj

BPJ uzrokuje značajne ekonomske gubitke u stočarskoj proizvodnji te gospodarstvu općenito. Izravni troškovi uključuju gubitke nastale smanjenim prirastom, padom mliječnosti i plodnosti, lošom kvalitetom vune te uginućima i liječenjima životinja. Neizravni troškovi vezni su uz provedbu programa nadziranja, ograničenja u trgovini živim životinjama te zametnim proizvodima, kontrolu bolesti (cijepljenje, tretiranje insekticidima), praćenje vektora i administrativne aktivnosti i značajno su veći od izravnih posljedica bolesti. (RUSHTON i LYONS, 2015.).

Ekonomski gubitci nakon izbijanja BPJ 1996. godine procijenjeni su na globalnom nivou na više od 3 bilijuna američkih dolara. Izniman epizootiološki značaj predstavlja izbijanje BPJ serotipa 8 u zapadnoj i sjevernoj Europi tijekom 2006. - 2008. godine kad zbog neuobičajeno visoke virulencije soja koja je uzrokovala bolest u svih domaćih preživača dolazi do vrlo velikih ekonomskih gubitaka (SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.). Procijenjeno je da su troškovi izbijanja serotipa 8 u Francuskoj 2007. godine iznosili 1,4 milijarde dolara, a gubici su uvelike bili posljedica ograničenjima u trgovini živim životinjama na međunarodnom tržištu. U Nizozemskoj su troškovi dosegili 85 milijuna dolara. Troškovi izbijanja BPJ u Njemačkoj tijekom razdoblja od 2006. do 2018. godine iznosili u prosjeku 180 milijuna eura, od čega 73% (132,1 milijuna Eura) otpada na neizravne troškove, a 27% (48,3 milijuna Eura) na izravne troškove. Najveći trošak predstavljalo je cijepljenje za koje je utrošeno 89 milijuna Eura (49,9% ukupnih troškova) (GETHMANN i sur., 2020.).

Uvažavajući širenje i posljedice koje je izbijanje BPJ uzrokovalo, Svjetska organizacija za zdravlje životinja (*World Organisation for Animal Health (OIE)*) je još sredinom 1960. godine klasificirala BPJ kao bolest „A liste“ čija brzina širenja i pojava uzrokuju značajne gospodarske posljedice u sektoru stočarske proizvodnje te je u kategoriji obvezno prijavljivanih bolesti, koju prate stroge mjere i ograničenja premještanja životinja.

2.5. Epizootiologija

BPJ je nekontagiozna, vektorska bolest domaćih i divljih preživača čiji su biološki vektori različite vrste komarčića roda *Culicoides*. Unatoč dokazima da se neki serotipovi BPJ mogu prenositi horizontalno, transplacentarno i/ili kolostrumom, prijenos virusa ubodom zaraženog vektora ipak se smatra dominantnim načinom prijenosa. Iako se ova bolest intenzivno istražuje već desetljećima o čemu će svjedočiti podatci navedeni u daljnjem tekstu, brojna su pitanja još uvijek neodgovorena. Određivanje mjera nadzora, kontrole i prevencije tako značajno otežava

nepotpuno razumijevanje ekologije vektora, kao i dinamike kretanja i održavanja BPJ na određenom području.

2.5.1. Način širenja

Četiri su moguća načina unosa virusa na slobodna područja: 1) premještanjem zaraženih životinja, 2) transportom zaraženog sjemena i embrija, 3) zaraženim vektorima pasivno (vektori nošeni vjetrom) ili aktivno (letenjem vektora) i 4) vektorima nošenim neživim sredstvima.

Distribucija i gustoća prijemljivih domaćina, trajanje viremije, postojanje i kapacitet lokalne populacije vektora i temperatura okoliša utječu na daljnje širenje bolesti. U povoljnim uvjetima virus BPJ će se u određenom području održavati beskrajnim nizom naizmjeničnih ciklusa replikacije u vektorima i različitim vrstama preživača.

2.5.1.1. Širenje vektorima

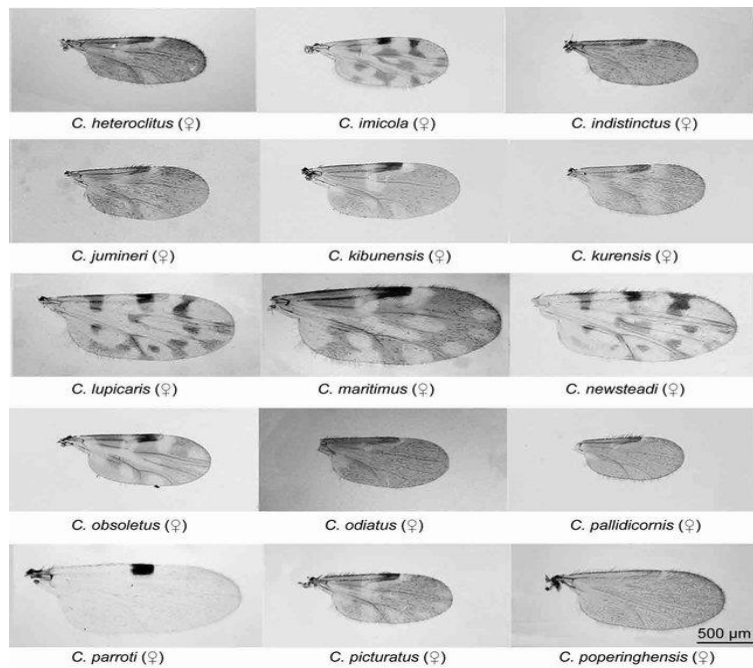
2.5.1.1.1. Biologija i ekologija komarčića roda *Culicoides*

Komarčići roda *Culicoides* (Latreille, 1809.) (Slika 4.) jedni su od najmanjih do sada opisanih hematofagnih insekata, duljine tijela 1 do 3 mm (MELLOR i sur., 2000.). Pripadaju razredu Insecta, redu Diptera, podredu Nematocera i porodici Ceratopogonidae. Unutar roda razlikujemo 31 podrod i nešto manje od 1400 različitih vrsta (BORKENT, 2014.a.; HARUP i sur. 2015.).



Slika 4. Komarčić roda *Culicoides* spp. (adult)
 (Izvor: <https://www.veterinaryparasitology.com/culicoides.html>, 2021.)

Tradicionalno, razlikovanje pojedinih vrsta unutar roda *Culicoides* zasnivalo se uglavnom na morfološkim značajkama krila (Slika 5.) (RAWLINGS, 1997.; BOORMAN i sur., 2007.).



Slika 5. Prikaz krila nekih vrsta komarčića roda *Culicoides* prisutnih u Europi (Izvor: TALAVERA i sur., 2011.)

Razvoj molekularne entomologije pružio je dobru i brzu alternativu, pa je danas filogenetska karakterizacija vrsta sve više u upotrebi (TAUTZ i sur., 2003.; HARRUP i sur., 2015.).

Komarčići roda *Culicoides* pronađeni su na svim kontinentima izuzev Antartike (MELLOR i sur., 2000.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.). Ipak, njihova je brojnost najveća u toplom, vlažnom i blatnom okruženju koje je bogato organskom tvari. Obzirom da je njih čak 96% obveznih hematofaga (MEISWINKEL i sur., 1994.) važno je i da se u blizini nalaze životinje odnosno domaćini na kojima se mogu hraniti.

Trajanje razvojnog ciklusa komarčića usko je vezano i uz vanjsku temperaturu, a odvija se u četiri faze; jaja, larva (4 razvojna stadija), kukuljica i adult. Tako primjerice, u pojasu tropske klime razvojni ciklus može trajati svega sedam dana, a u umjerenom klimatskom području i do sedam mjeseci (MELLOR i sur. 2000.; WITTMANN i BAYLIS, 2000.). Na temperaturama od 21-28⁰C od polaganja jajašca do presvlačenja kukuljice u adultnu jedinku prođe u prosjeku dva do šest tjedana (VERONESI i sur., 2009.). Adultne jedinke žive 10-20 dana, no u hladnijim uvjetima mogu preživjeti i do tri mjeseca (LYSYK i DANYK, 2007.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.). Mužjaci se hrane biljnim sokovima, a ženke krvlju koja im je potrebna kao izvor proteina za proizvodnju jaja (WILSON i MELLOR, 2008.). Tijekom svake godine u umjerenom klimatskom području uobičajeno se pojave dvije generacije komarčića, ona brojnija u proljeće i nešto manja u ljeto, dok se u područjima tropske klime izmjena generacija komarčića odvija tokom cijele godine (RIEB, 1982.; SAEGERMAN i sur., 2008.). Preživljavanje, aktivnost i distribucija komarčića roda *Culicoides* također su pod izravnim utjecajem meteoroloških čimbenika (temperature, vlage i vjetra). Temperatura je nedvojbeno glavni okolišni čimbenik koji determinira ponašanje i preživljavanje vektora. Ovisno o vrsti, komarčići su najaktivniji pri temperaturi od 13⁰C do 35⁰C (BRAVERMAN i CHECHIK, 1996.). Visoka razina vlage također je značajan čimbenik (MURRAY, 1991.). Isušivanjem okoliša u kojem obitavaju brzo ugibaju te se za vrijeme suhog razdoblja sklanjaju u grmlje ili dijelove

okoliša gdje su zaštićeni, čekajući povoljan trenutak za daljnji razvoj i aktivnost. Na aktivnost nepovoljno utječe i kiša jer otežava letenje (SAEGERMAN i sur., 2008.). Sukladno tome aktivnost odraslih komarčića najveća je u proljeće i jesen (PURSE i sur., 2005.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.) i to u zoru, najčešće jedan sat prije izlaska sunca te u sumrak, do jednog sata nakon zalaska sunca (MELLOR i sur., 2000.).

Komarčići roda *Culicoides* spadaju većinom u skupinu egzofilnih i egzofagnih insekta što znači da žive i hrane se na otvorenim prostorima. Postoje i izuzetci pa neke vrste, kao *C. obsoletus* i *C. dewulfi*, pokazuju endofagno ponašanje hraneći se na životinjama unutar objekata.

2.5.1.1.2. Komarčići roda *Culicoides* kao biološki vektori BPJ

Komarčići roda *Culicoides* biološki su vektori najmanje 60 različitih virusnih i parazitarnih bolesti koje se javljaju u ljudi i životinja (FOXI i sur., 2020.). Prvi se put spominju 1927. godine kao prijenosnici filarije *Mansonella perstans* u ljudi u zapadnoj Africi (MEISWINKEL i sur., 1994.). Njihova uloga u sektoru stočarske proizvodnje počinje se pratiti od 1944. godine kad je dokazano da je komarčić *C. imicola* biološki vektor BPJ i afričke konjske kuge (DU TOIT, 1944.; COX, 1954.). Pojedine vrste ovog roda identificirane su i kao vektori virusa epizootijske hemoragijske bolesti (EHDV) i Orthobunyavirusa – virusa bolesti Schmallerberga (ELBERS i sur., 2013.).

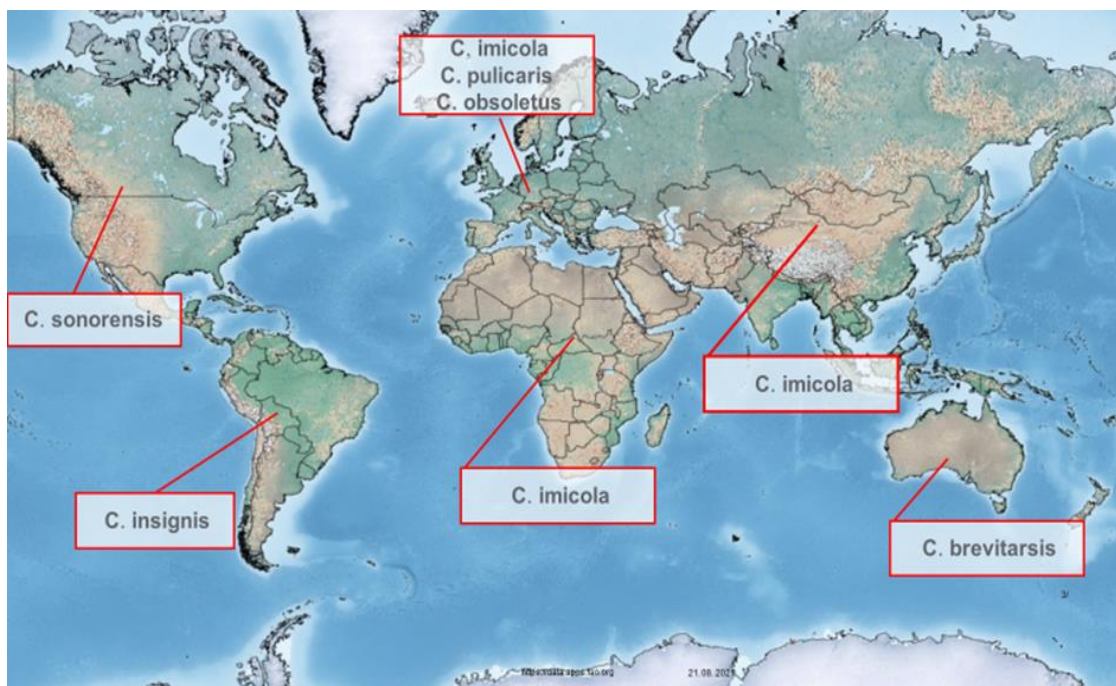
Umnažanje virusa u komarčićima počinje nakon ingestije krvi viremične životinje i unosa virusa u njihov probavni trakt. U srednjem crijevu, nakon umnažanja u crijevnim stanicama, virus prolazi kroz bazalnu membranu i ulazi u hemokelu kojom se širi u druge organe uključujući i slinske žlijezde u kojima se odvija drugi ciklus replikacije. Nakon toga zaraženi komarčić sposoban je za daljnje širenje bolesti. Jednom zaraženi vektor ostaje zaražen do kraja svog životnog vijeka (MELLOR, 1990., 2004.; WITTMANN i sur., 2002.; WILSON i sur., 2004.), a za prijenos virusa na domaćina dovoljan je samo jedan ubod (MERTENS i MELLOR, 2003.).

Vremensko razdoblje od ingestije inficirane krvi do faze u kojoj vektor može prenijeti infekciju na drugog domaćina naziva se ekstrinzični inkubacijski period, a njegovo trajanje ovisi o klimatskim čimbenicima, posebice temperaturi okoliša i vlazi. Na temperaturi od 15⁰ C ekstrinzični inkubacijski period traje nekoliko tjedana, a na 30⁰ C svega nekoliko dana (WITTMANN i sur., 2002.). Na temperaturama ispod 12⁰ C replikacija potpuno prestaje, no virus perzistira u zaraženih komarčića i nastavlja se replicirati čim temperatura ponovno poraste (WELLBY i sur., 1996.). Okolišna temperatura utječe i na vrijeme potrebno vektoru da probavi krvni obrok, pa tako više temperature povećavaju učestalost njegova hranjenja. Drugim riječima, neposredan učinak porasta temperature očituje se u skraćivanju vremena replikacije virusa i povećanju mogućnosti njegova prijenosa (WILSON i MELLOR, 2009.). Vertikalni prijenos virusa s odrasle ženke na nezrele razvojne stadije te kasnije juvenilne komarčiće kao i transovarijalni prijenos s ženke na potomstvo do danas nisu dokazani (OSBORNE i sur., 2015.; EFSA, 2017.). Iako se ove vrste komarčića mogu hraniti na različitim vrstama životinja i čovjeku, primijećeno je da se oni ipak najčešće hrane na govedima. Vjerojatno se upravo zbog toga infekcija BPJ u sezoni u umjerenom klimatskom pojasu prvo javlja u goveda u kojima se virus umnoži, a tek onda pri kraju ljeta i tijekom jeseni obolijevaju ovce.

Sredinom prošlog stoljeća smatralo se da je *C. imicola* jedini kompetentni vektor BPJ. Provedena entomološka istraživanja dokazala su da i komarčići iz *C. obsoletus* i *C. pulicaris* kompleksa ubadaju životinje i prisutni su na gospodarstvima u većem broju (KETTLE i LAWSON, 1952.; CAMPBELL i PELHAM-CLINTON, 1960.) što ih čini potencijalnim vektorima virusa BPJ. Ipak, kako je distribucija BPJ u Europi prije 1998. odgovarala poznatoj rasprostranjenosti *C. imicola*, pretpostavljalo se da, unatoč ranijim nalazima, ove vrste nisu sposobne za prijenos virusa BPJ. Prvi dokazi da se virus BPJ njima ipak može prenositi dobiveni su tijekom epizootije na Cipru kad je virus BPJ serotipa 4 izdvojen iz ženki *C. obsoletus* kompleksa (MELLOR i PITZOLIS, 1979.).

Širenje BPJ nakon 1998. godine na područja Europe na kojima nije dokazano prisustvo *C. imicola*, te činjenica da su *Obsoletus* i *Pulicaris* kompleks ubikvitarne vrste komarčića u cijeloj palearktičkoj zoni, pobijaju prethodne pretpostavke i, zajedno s opisanim istraživanjima, ukazuju da je najmanje jedna vrsta *Obsoletus* kompleksa i vjerojatno jedna ili više vrsta *Pulicaris* kompleksa sposobna učinkovito djelovati kao vektor virusa BPJ (WILSON i MELLOR, 2009.). Evidentna potvrda navedenog je unos BPJ u područja sjeverne Europe gdje je dokazano da je porast temperature utjecao na povećanje sposobnosti autohtonih vrsta komarčića roda *Culicoides* za prijenos virusa BPJ (MEHLHORN i sur., 2007.; GALE i sur., 2009.; MACLACHLAN, 2010.).

Danas se oko 50 od 1400 danas poznatih vrsta komarčića roda *Culicoides* smatra kompetentnim vektorima BPJ (WILSON i MELLOR, 2009.), a znamo i da klimatske promjene te globalno zatopljenje značajno utječu na geografsku proširenost vektora i na interakciju odnosa patogen – vektor. Unatoč činjenici da više različitih vrsta predstavlja kompetentne vektore BPJ, *C. imicola* smatramo najvažnijom vektorskom vrstom za prijenos virusa u južnoj Europi, Africi i na Bliskom istoku, *C. sonorensis* u Sjevernoj Americi te *C. insignis* u Srednjoj i Južnoj Americi. Tijekom epizootije serotipa 8 u središnjoj i sjevernoj Europi i *C. obsoletus* izdvojen je kao vektor virusa BPJ, a *C. obsoletus* i *C. scoticus* (oba iz *Obsoletus* kompleksa) te *C. pulicaris* i *C. punctatus* (oba iz *Pulicaris* kompleksa) utvrđeni su kao najučestalije vrste komarčića roda *Culicoides* u tom području (MEHLHORN i sur., 2007.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.). (Slika 6.)



Slika 6. Geografska distribucija komarčića roda *Culicoides*, karta preuzeta s FAO <https://data.apps.fao.org>.

Komarčići roda *Culicoides* mogu letjeti do najviše 2 km dnevno, no zbog svoje veličine lako su nošeni vjetrom te dnevno pasivnim transportom mogu biti preneseni i do 700 km (DUCHEYNE i sur., 2007.). Prijenos BPJ iz područja sjeverne Afrike u Italiju (CALISTRİ i sur., 2004.) te iz Italije u Hrvatsku (LISTEŠ i sur., 2009.) potvrđuju teoriju pasivnog transporta vjetrom preko velikih vodenih površina kao što su Sredozemno ili Jadransko more (BURGIN i sur., 2013.; EFSA, 2017.). Ta teorija je i dokazana razvojem modela atmosferske disperzije koji je, temeljem parametara neophodnih za simulaciju leta komarčića roda *Culicoides* i entomoloških podataka o aktivnosti vektora u Velikoj Britaniji, potvrdio širenje serotipa 8 iz središnje Europe u Veliku Britaniju (SZMARAGD i sur., 2010.).

2.5.1.2. Atipični načini širenja BPJ

Iako se prijenos virusa ubodom zaraženog komarčića smatra dominantnim načinom prijenosa, postoje dokazi da se neki serotipovi BPJ mogu prenositi i horizontalno, transplacentalno i/ili kolostrumom (MENZIES, 2008.; MAYO, 2010.; VAN DER SLUIJS 2011.). Također je dokazan prijenos sjemenom bikova ukoliko je sjeme prikupljeno od životinje koja je u viremiji

(HOWARD i sur., 1985). Prijenos BPJ premještanjem zaraženih životinja može imati ulogu u promjeni mjesta izbijanja bolesti, no isto je dugoročno značajno samo ukoliko lokalno dominantni vektor može učinkovito prihvatiti i prenijeti uneseni virus. Primjer takvog širenja bolesti je bio uvoz gravidnih junica u Irsku iz Nizozemske kada je unos serotipa 8 dokazan kao posljedica transplacentalnog prijenosa te prijenosa izravnim kontaktom oralnim putem nakon ingestije sijena u kojem su se nalazile odbačene placentе zaraženih krava (MENZIES i sur., 2008.). Alimentarni način širenja BPJ dokazan je u teladi nakon hranjenja kolostrumom zaraženih krava (MAYO i sur., 2010.), u pasa nakon hranidbe kontaminiranom hranom podrijetlom od inficiranih životinja (OURA i sur., 2011.), i u euroazijskih risova (*Lynx lynx*) koji su hranjeni pobačenim fetusima podrijetlom sa zaraženog gospodarstva (JAUNIAUX i sur., 2008.).

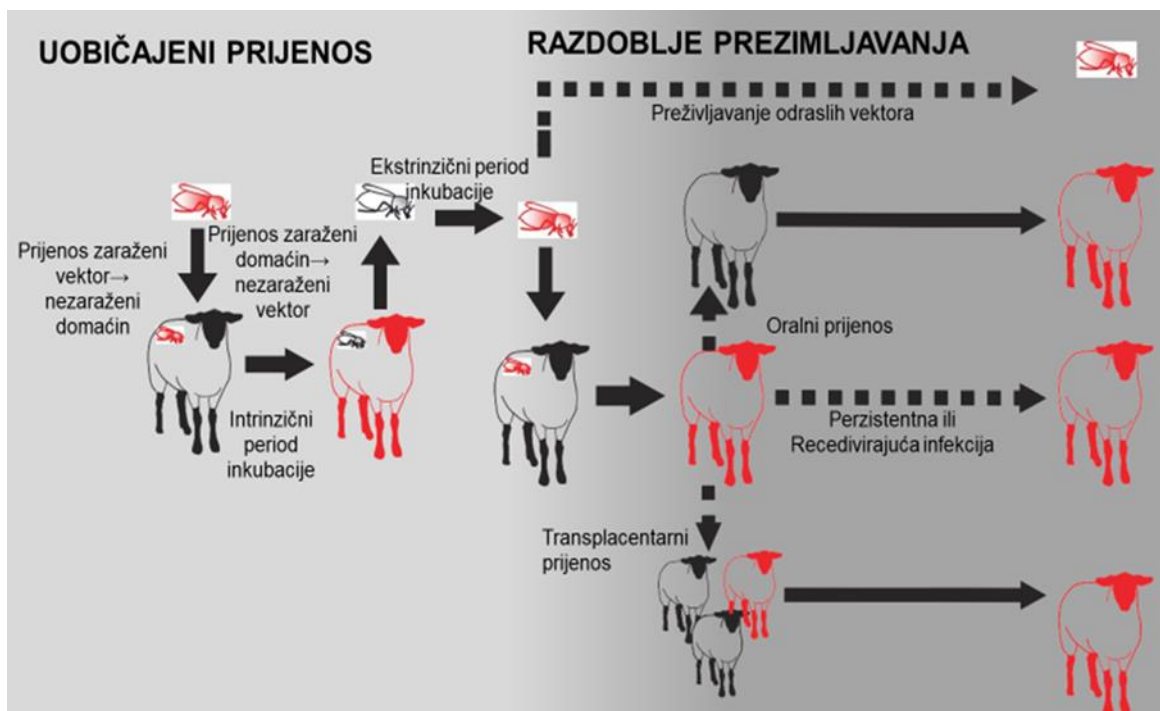
Serotipove 25, 26 i 27 koji su izdvojeni samo u malih preživaca karakterizira prienos neovisan o vektorima jer isti ne mogu zaraziti niti jednu do sada poznatu vrstu komarčića roda *Culicoides*. Pretpostavka je da je primarni put njihova širenja direktnim kontaktom, vjerojatno aerosolom (BATTEN i sur., 2014.; EFSA, 2017.). BPJ može se prenijeti i kontaminiranim biološkim proizvodima. Zabilježeno je oboljenje gravidnih kuja nastalo kao posljedica primjene živih cjepiva kontaminiranih virusom BPJ (WILBUR i sur., 1994.). Dokazan je i mehanički prienos virusa BPJ jatrogeno putem opreme i igala kontaminiranih krvlju zaražene životinje (SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011.). Antropogeni utjecaj u širenju BPJ ima značaj pri ilegalnoj uporabi neodobrenih vrsta cjepiva, ali i globalnom kretanju ljudi i roba. Unatoč brojnim istraživanjima provedenim u području atipičnih načina prijenosa BPJ, njihov značaj u ekologiji BPJ ipak još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

2.5.1.3. Sezonalnost i prezimljavanje virusa

U umjerenoj klimatskoj zoni bolest se javlja najčešće u ranu jesen ili početkom zime, a u subtropskoj klimatskoj zoni u proljeće ili rano ljeto. Ranije se, zbog izraženih sezonalnih osobina vektora, smatralo da je prijenos BPJ u umjerenom pojasu moguć samo za toplijeg doba godine. Obzirom na vremenski ograničenu viremiju u domaćina i činjenice da transovarijski prijenos u vektora nije dokazan pretpostavljalo se da će u hladnom periodu godine, tijekom kojeg ne postoji aktivnost vektora, bolest nestati. Nakon prve epizootije serotipa 8 u sjevernoj i središnjoj Europi 2006. godine te ponovnih izbijanja bolesti uzrokovanih istim serotipom 2007. i 2008. godine postavilo se pitanje preživljavanja virusa tijekom zimskih mjeseci (MAYO i sur., 2014.). Smatra se da većina odraslih komarčića roda *Culicoides* vjerojatno nema mogućnost preživljavanja hladnog zimskog razdoblja u sjevernoj Europi, a kako je već spomenuto, do danas nije dokazan ni transovarijski prijenos virusa na sljedeće generacije vektora (EFSA, 2017.).

Istraživanja su provedena i na drugim mehaničkim vektorima, kao potencijalnim rezervoarima virusa BPJ. Utvrđeno je da krpelji imaju vektorski potencijal za virus BPJ te da on u određenim vrstama krpelja može preživjeti i do 26 dana, ali nije razjašnjen način prijenosa s krpelja na domaćina kao i sa sigurnošću dokazana mogućnost prezimljavanja virusa u krpeljima (BOUWKNEGT i sur., 2010.).

Rezultati dostupnih studija ukazuju da divlji preživači vrlo vjerojatno imaju određenu ulogu u cirkulaciji virusa i održavanju infekcije BPJ u određenom području, posebice ako je gustoća kompetitivne vrste domaćih preživača niska. Ipak, njihova uloga u prezimljavanju virusa još uvijek nije potvrđena (RUIZ-FONS i sur., 2014.; EFSA, 2017.).(Slika 7.)



Slika 7. Prijenos virusa BPJ (Izvor: WILSON i sur., 2008.)

2.5.2. Vrste životinja prijemljive na BPJ

Svi domaći i divlji preživači (uključujući kamelide i cervide) prijemljivi su na infekciju virusom BPJ i smatraju se potencijalnim domaćinima (COETZEE i sur., 2012.). Ipak postoje značajne razlike u dispoziciji prema infekciji, ali i u kliničkom očitovanju ove bolesti. Klinički manifestni oblici bolesti najčešći su u ovaca i bjelorepih jelena (*Odocoileus virginianus*) (PARSONSON, 1990.; JOHNSON i sur. 2006.). Zabilježena je i pasminska dispozicija koja je vezana uz značajne varijacije u učestalosti pojave i jačini kliničkih znakova. Stare, autohtone pasmine iz endemskih područja nakon infekcije s endemskim serotipovima (topotipovima) uglavnom razviju subkliničku infekciju, dok u novouvedenih, visokoproduktivnih pasmina dolazi do kliničkog očitovanja bolesti. Ipak, dokazano je da i te autohtone pasmine mogu očitovati kliničke znakove ukoliko se inficiraju drugačijim, novo unesenim serotipovima odnosno egzotičnim topotipovima (PRASAD i sur., 2009.; RAO i sur., 2017.).

Koze i goveda uglavnom karakterizira subklinička infekcija (MACLACHLAN i sur., 2009.). Kliničko očitovanje bolesti u goveda i koza vrlo je rijetko, a akutni oblik bolesti zabilježen je u slučajevima širenja virusa u nova područja i imunološki naivnu populaciju životinja. Takvu iznimku predstavlja epizootija serotipa 8 u zapadnoj i srednjoj Europi tijekom koje je klinička bolest zabilježena u većeg broja goveda i koza (DARPEL i sur., 2007.; ELBERS i sur., 2008.a). Bez obzira na isto, u endemskim područjima goveda (ali i koze) se, zbog produljene viremije koja se obično javlja u odsutnosti kliničkih znakova, smatraju nosiocima virusa BPJ te imaju važnu ulogu u održavanju BPJ na određenom području (TWEEDLE i MELLOR, 2002.; COETZEE i sur., 2012., EFSA, 2017.).

Osim preživača virus BPJ može inficirati i pojedine mesojede. Prijenos je tako dokazan u pasa (EVERMANN, 2008.) i euroazijskih risova (*Lynx lynx*) držanih u zoološkom vrtu (JAUNIAUX i sur., 2008.). Prisustvo specifičnih protutijela dokazano je i u serumu afričkih karnivora (lavova, hijena, divljih pasa, zapadnoafričke cibetke (lat. *Genetta pardina*), afričkog čaglja), floridskog crnog medvjeda i floridske pume (SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.; EFSA, 2017.).

BPJ nema zoonotski karakter te prema klasifikaciji u odnosu na potencijalni rizik ne spada u skupinu bolesti čiji uzročnik predstavlja agens s bioterorističkim potencijalom (VITANOVSKI i SOVILJ, 2017.).

2.5.3. Pobol i pomor

Stopa pobola i pomora kod BPJ u preživača vrlo su promjenjive te niže u goveda i koza nego u ovaca. Pobol u visoko osjetljivih preživača, kao što su ovce kreće se od 2 do 75%, a može dosegnuti i 100%. Pomor u prosjeku varira od 2% do 30% ovisno o serotipu i pasmini životinje. U područjima gdje je pojava bolesti sporadična i gdje populacija životinja nije cijepljena može dosegnuti i do 75% (CALISTRİ i sur., 2003.). Epizootija serotipa 8 u goveda u Europi uzrokovala je prosječni pobol od 5% i pomor manji od 1% u zahvaćenim stadima (WILSON i

MELLOR 2009). Tijekom 2006. i 2007. godine u Njemačkoj je stopa pomora varirala od 37,5%, do 41,5% kod ovaca, od 6,4% do 13,1% kod goveda te do 26% u koza (CONRATHS i sur., 2009.).

2.6. Patogeneza bolesti plavog jezika

Sva dosadašnja istraživanja podupiru činjenicu da su patogenetski mehanizmi u svih preživača isti, ali se funkcijski i strukturni poremećaji koji rezultiraju pojavom i intenzitetom kliničkih znakova izrazito razlikuju. Na njih utječu brojni čimbenici kao što su vrsta i pasmina domaćina te njihovo podrijetlo (autohtona ili imunološki naivna vrsta na nekom području), serotip i topotip virusa, imuni status domaćina i kombinacija oštećenja nastalih kao posljedica imunološkog odgovora domaćina (RAO i sur., 2017.).

Nakon inokulacije ubodom inficiranog komarčića roda *Culicoides*, virus BPJ putem dendritičnih stanica kože putuje do područnih limfnih čvorova gdje započinje inicijalni ciklus umnažanja (HEMATI i sur., 2009.; DARPEL i sur., 2012). Potom putem mononuklearnih stanica periferne krvi biva prenesen u brojna tkiva, u kojima se replikacija odvija uglavnom unutar mononuklearnih fagocita i endotelnih stanica, limfocita te u manjoj mjeri drugih vrsta stanica (BARRATT-BOYES i MACLACHLAN, 1994., 1995.; MACLACHLAN i sur., 2009.).

U ranoj fazi viremije virus BPJ povezan je sa svim krvnim stanicama, a titar virusa proporcionalan je broju određene vrste stanica u krvi. Sukladno tome, u inicijalnoj fazi najviše virusa nalazimo u trombocitima i eritrocitima, no zbog kratkog životnog vijeka trombocita u kasnijoj fazi viremije vezan je uglavnom za eritrocite (MACLACHLAN i sur., 2009.). Virus je u plazmi prisutan samo kratkotrajno, u niskom titru. Obzirom da se u koštanoj srži, također u niskom titru, virus može dokazati samo na kraju viremije, smatra se da ima afinitet isključivo za zrele eritrocite (BARRATT-BOYES i MACLACHLAN, 1995.; MACLACHLAN, 1994.; MACLACHLAN i sur. 2009; SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011) .

Vrhunac viremije podudara se s razdobljem povišene temperature, a javlja se prije serokonverzije i pojave neutralizacijskih protutijela (AFSHAR, 1994.; ROJAS i sur., 2019.).

Sekvestracija virusa u membranu eritrocita ima ulogu u produljenju viremije preživača te omogućuje cirkulaciju virusa i u vrijeme kada su neutralizacijska protutijela prisutna u visokom titru. Vežanjem na eritrocite virus se štiti od neutralizacijskih protutijela te se razdoblje viremije produžuje, a isto izravno utječe na produljenu mogućnost infekcije vektora (BREWER i MACLACHLAN, 1992.).

Za serotipove virusa BPJ koji se dokazano prenose vektorima (serotipovi 1-24) razina viremije i njezino trajanje ključni su čimbenici. Smatra se da viremija u zaraženih životinja (posebice goveda) ima produljen tijek, ali nije trajna (BARRATT-BOYES i MACLACHLAN, 1995.; BONNEAU i sur., 2002.; MELVILLE i sur., 2004.) te ovisi o životnom vijeku eritrocita za koje je virus vezan (MACLACHLAN i sur., 2009.). Za potrebe izrade znanstvenih studija o BPJ, temeljem dosadašnjih znanstvenih spoznaja, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) viremiju BPJ definira kao razdoblje u kojem se cirkulaciju i umnožavanje virusa u krvi može detektirati izdvajanjem virusa (EFSA, 2007.a, 2017.). Virusna RNK može se utvrditi i RT-PCR testom, no Katz i suradnici (1994.) utvrdili su je da je fizikalno stanje cirkulirajuće nukleinske kiseline virusa BPJ nepoznato te nije u potpunosti razjašnjeno je li nukleinska kiselina u degradiranom i inaktiviranom stanju ili inkapsulirana u strukturno netaknut i potencijalno zarazni oblik. Konvencionalnom metodom izdvajanja virusa na embrioniranim kokošjim jajima te ponovnom inokulacijom sentinel životinja nisu uspjeli obnoviti infektivnost virusa BPJ iz krvi ovaca i goveda, iako se virusna RNK mogla utvrditi u krvi. Ako je virusna RNK inkapsulirana tada postoji i vjerojatnost da pretpostavljeno netaknute čestice virusa BPJ mogu ostati neotkrivene primjenom konvencionalnih metoda izdvajanja virusa na embrioniranim kokošjim jajima te ponovnom inokulacijom na sentinel životinjama (BARRATT-BOYES i MACLACHLAN, 1995.; MACLACHLAN i sur., 2009.).

EFSA u posljednjem znanstvenom mišljenju iz 2017. godine navodi da se virus u krvi RT-PCR testom u goveda može dokazati tijekom 156 dana (BARROS i sur., 2009.), a kod ovaca 140 dana od početka viremije (BONNEAU i sur., 2002.). Ukoliko se pak određuje izdvajanjem virusa, viremija u ovaca traje 14 do 54 dana, u koza 19 do 54 dana (KOUMBATI i sur.1999.; SAVINI i sur., 2001.), a u goveda do 60 i više dana (čak do 100) (SELLERS I TAYLOR, 1980.; SINGER i sur., 2001.). Uzimajući u obzir znanstvenu literaturu te temeljem analize podataka koja je ukazala da je vjerojatnost da će viremija BPJ trajati manje od devet tjedana kod odraslih goveda veća od 99%, Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE) službeno smatra da za preživače viremija traje najviše 60 dana (ANONYMOUS, 2021.).

Patogenezu BPJ karakteriziraju oštećenja malih krvnih žila ciljnih tkiva što se očituje vaskularnom okluzijom i infarktom. Vazoaktivni medijatori koje proizvode trombociti, dendritičke stanice, makrofagi i endotelne stanice inficirane virusom BPJ povećavaju oštećenje endotela, ometaju njegovu funkciju što pak dovodi do povećanja vaskularne propusnosti i posljedičnog razvoja edema, vaskularne tromboze, krvarenja i infarkta (MACLACHLAN i sur., 2009.; DARPEL i sur., 2012.; RAO i sur., 2017.).

Na staničnoj razini dolazi do nekroze i apoptoze inficiranih stanica, što pak potpomognuto određenim enzimima dovodi do pojave vaskularne propusnosti. Pokretanjem određenih biokemijskih procesa nastaje opsežan upalni odgovor na posljedično oštećenje stanica i tkiva zaražene životinje (BARRATT-BOYES i sur., 1992.; DEMAULA i sur., 2001.; MACLACHLAN i ZIENTARA, 2008.). Do danas nije potpuno razjašnjeno zašto određeni serotipovi virusa BPJ uzrokuju bolest u ovaca, a ne i u goveda kad je patogenetski mehanizmi u obje vrste preživača isti (MACLACHLAN i sur., 2009.). U ovaca i bjelorepih jelena nastaju značajna oštećenja endotela, dok isto nije uočeno kod goveda. Uzrok tome je vjerojatno niža osjetljivost endotelnih stanica goveda na infekciju virusom BPJ koja rezultira njihovom

aktivacijom odnosno proizvodnjom vazoaktivnih i upalnih medijatora, dok će infekcija endotelih stanica u ovaca rezultirati brzom citolizom uz minimalnu aktivaciju. Omjer tromboksana i prostaciklina koji je indikativan za poremećaje koagulacije viši je u inficiranih ovaca nego u goveda (DEMAULA i sur., 2001., 2002.).

Mehanizam transplacentalnog prolaska virusa BPJ još nije do kraja razjašnjen (MACLACHLAN i sur., 2009.). Prolaz virusa kroz placentu u prvoj polovici gravidnosti može uzrokovati malformacije mozga, kao hidrocefalus i moždanu hipoplaziju (OSBURN, 1994.). Tijekom epizootije serotipom 8 u Nizozemskoj 2007. godine prvi je put primijećena pojava hidrocefalusa u pobačenih fetusa i novorođene teladi. Vertikalni prijenos BPJ i teratogeni potencijal prethodno su opisani samo kod uporabe modificiranih živih cjepiva protiv BPJ i nisu bili povezani uz infekciju terenskim sojevima virusa. Stoga se otvara pitanje je li virus BPJ serotipa 8 eventualno ranije bio prilagođen u laboratorijskim uvjetima (WOUDA i sur., 2009.).

2.7. Klinička slika

BPJ se najčešće javlja u obliku inaparentne infekcije, bez vidljivih kliničkih znakova bolesti, a značajne razlike uočene su u pobolu i pomoru ovisno o serotipu i virulenciji virusa, pasmini, dobi životinja, stresorima i hranidbi (MACLACHLAN, 1994.). Na bolest je osjetljivija imunološki naivna populacija životinja, posebice pri unosu novih pasmina u enzooska područja BPJ (WARD, 1994.). Klinički oblik BPJ uglavnom se javlja u ovaca i manjeg broja divljih preživača, dok je u goveda, koza i većine vrsta divljih preživača bolest uglavnom asimptomatska. Ipak, pojedini sojevi, kao npr. soj serotipa 8, mogu izazvati teški klinički oblik bolesti i u goveda i kamelida (BACKX i sur., 2007.; DARPEL i sur., 2007.; MACLACHLAN i sur., 2009.). Životinje koje prebole BPJ karakterizira produženi period oporavka tijekom kojeg se bilježe gubitci u proizvodnji mlijeka, prirastu, kvaliteti vune i smanjenoj plodnosti (COETZEE i sur., 2012.).

2.7.1. Bolest plavog jezika u ovaca

Infekcija BPJ javlja se su svih ovaca, ali razvoj kliničkih znakova ovisi o pasminskim svojstvima. Utvrđene su varijacije u prijemljivosti te kliničkom očitovanju bolesti u ovaca iz različitih geografskih područja. Tako autohtone, niže-produktivne tropske ili suptropske pasmine ovaca obolijevaju asimptomaski nakon infekcije endemskim sojevima virusa, dok visokoproduktivne, naivne pasmine obole težim oblikom bolesti (PRASAD i sur. 2009.; VERONESI i sur., 2010; RAO i sur., 2017.). Znanstveni članci koji opisuju izbijanja BPJ u Europi potvrđuju i izrazitu varijabilnost kliničkog tijeka unutar jedinki iste pasmine, pa čak i unutar istog stada (EFSA, 2017.).

Inkubacija BPJ u ovaca traje prosječno oko sedam dana, no pokusnim infekcijama dokazano je da može iznositi od dva do 15 dana. Bolest se javlja u akutnom, subakutnom i kroničnom obliku. Akutni oblik BPJ započinje povišenom tjelesnom temperaturom (41 do 42⁰C) koja u prosjeku traje sedam dana (2-11 dana) (ERASMUS, 1975.). Hiperemija sluznice usne šupljine i nosa praćena obilnim slinjenjem, seroznim iscjetkom iz očiju i nosa koji postaje mukopurulentan (Slika 8.) i sadrži primjese krvi mogu se uočiti dva do tri dana nakon povišenja tjelesne temperature (PARSONSON i sur., 1994.; MACLACHLAN i sur., 2009.). Iscjedak se sušenjem pretvara u kraste (Slika 9.). Razvijaju se edem usana, jezika i međuviličnog prostora, a na sluznici usta javljaju se petehijalna krvarenja. Rijetko, u iznimno teškim slučajevima, jezik je toliko otečen i edematozan da viri van usne šupljine. U takvim se slučajevima javlja cijanoza a jezik poprima plavu boju (Slika 10.). Sa strane jezika vidljive su žute ili jantaraste lezije, dok prednji dio može biti gotovo potpuno lišen epitela (Slika 11.). Nakon pet do osam dana od pojave bolesti uz pad tjelesne temperature javljaju se nekrotične promjene na sluznici usta i posljedično smrdljivi zadah. Zbog boli uzrokovane otokom, erozijama i ulcerima životinje su anoreksične i potištene. Sasušene kraste u nosu otežavaju disanje. Pri kraju bolesti razvija se upala papaka s vidljivim crvenilom krunskog ruba (Slika 12.) Papci su bolni i topli. Ovce sa

ovakvim promjenama šepaju, ne žele se kretati i stoje pogrbljeno (Slika 13.), leže ili pokušavaju hodati na oslanjajući se na karpalne i/ili tarzalne zglobove (ERASMUS, 1975.).



Slika 8. Mukozni iscjedak iz nosa (Ljubaznošću dr.sc. Listeša)



Slika 9. Sasušeni sekret i kraste na usnama i nosu (Ljubaznošću dr.sc. Listeša)



Slika 10. Edem usana i glave, cijanoza jezika (Izvor: WILSON i sur., 2008.)



Slika 11. Krvarenja, erozije i ulceri na sluznici usne šupljine (Ljubaznošću dr.sc. Listeša)



Slika 12. Crvenilo i otečenje krunskog ruba (Izvor: SAMINATHAN i sur. 2020.)



Slika 13. Pogrbljen stav uzrokovan bolnošću papaka (Izvor: <https://www.veeproholland.com>, 2021.)

Pojava krvavog proljeva ili povraćanje nastalog zbog edema jednjaka, a koje za posljedicu može imati aspiracijsku upalu pluća, loši su prognostički znakovi i takvi slučajevi uglavnom

završavaju letalno. Uginuća se kod akutnog oblika u prosjeku javljaju jedan do osam dana nakon pojave kliničkih znakova (ERASMUS, 1975.).

Subakutni oblik BPJ u ovaca javlja se uglavnom u pasmina koje su otporne na bolest (ERASMUS, 1975.), a često se očituje samo umjereno povišenom tjelesnom temperaturom. Rijetko se uoče mršavost i slabost.

Kronični oblik bolesti pak karakterizira izrazita slabost i tortikolis. Kvaliteta vune je narušena. Vuna se lomi te otpada u pramenovima. Javlja se sekundarna bakterijska pneumonija, uglavnom uzrokovana bakterijama roda *Pasteurella* (ERASMUS 1990.; PARSONSON 1990.; DARPEL i sur. 2007.; SAMINATHAN i sur. 2020.).

Infekcija tijekom ranog graviditeta (5. ili 6. tjedan gestacije) može rezultirati pobačajima, mumificiranim plodovima i rađanjem avitalne mladunčadi s kongenitalnim poremećajima (hidrocefalus, cerebralne ciste, retinalna displazija) ili tjelesnim deformacijama (MACLACHLAN i sur., 2009.; DREW i sur., 2009.; RAO i sur., 2017.).

2.7.2. Bolest plavog jezika u goveda i koza

U goveda infekcija uglavnom prolazi klinički inaparentna ili je pak subakutnog tijeka. Iznimku predstavlja infekcija uzrokovana serotipom 8 koja može rezultirati očitovanjem klinički manifestinih oblika u brojnih vrsta životinja, uključujući i goveda (DARPEL i sur., 2007.; ELBERS i sur., 2008.b). Tijekom epizootije serotipom 8 bolest se u goveda očitovala povišenom tjelesnom temperaturom, apatijom i depresijom, erozijama i nekrozom sluznice nosa i usta, iscjetkom iz nosa, pojačanim slinjenjem, konjunktivitisom, laminitisom, koronitisom te povremeno krvavim proljevom i edemom. Zabilježen je značajan pad mliječnosti, a nakon preboljenja dolazi do oporavka životinje. (THIRY i sur., 2006.; ELBERS i sur., 2008.a).

Infekcija krava u ranoj fazi gestacije može rezultirati ranom embrionalnom smrtnošću, pobačajima, malformacijama ploda te rođenjem avitalne teladi (MACLACHLAN i sur., 2000.;

DESMECHT i sur., 2008.). Fetusi inficirani između 70 do 130 dana gestacije mogu razviti značajne malformacije mozga, a ako infekcija nastane prije 70 dana gestacije najčešće se razvije blagi encefalitis (MACLACHLAN i sur., 2000.; SPEROLVA i ZENDULKOVA, 2011.).

Mali broj istraživanja proveden je vezano za BPJ u koza te se općenito smatra da infekcija uglavnom prolazi subklinički. Primjerice, tijekom epizootije na Cipru 1944. godine koze nisu razvijale kliničke oblike bolesti, iako su bile držane zajedno s ovcama (GAMBLES, 1949.). Iznimno, tijekom određenih epizootija opisuju se i klinička oboljenja koza, npr. epizootija u Indiji koja je trajala od 1961. do 1963. godine (SAPRE, 1964.) ili u Izraelu kad je zabilježena sporadična pojava blagih kliničkih znakova te pobačaja i rane neonatalne smrtnosti (BUMBAROV i sur., 2012.). Tijekom epizootije BPJ serotipa 8 u Europi također su zabilježeni klinički znakovi bolesti u koza i to povišena tjelesna temperatura, iscjedak iz nosa, edem usta i glave, potkožna krvarenja, pad mliječnosti i prirasta (DERCKSEN i sur., 2007.).

2.7.3. Bolest plavog jezika u drugih vrsta životinja

U divljih preživača na većem području Afrike, Europe, Sjeverne Amerike i Indije BPJ je endemična (SAMINATHAN i sur., 2020.). Klinički oblik BPJ utvrđen je i u bjelorepih jelena u kojih se razviju hemoragična dijateza i diseminirana intravaskularna koagulacija pa se bolest očituje hemoragijama po cijelom tijelu, otokom glave i vrata, pojačanim slinjenjem, nosnim iscjetkom i krvavim proljevom. Bolest je utvrđena i u muflona, bizona, mošusnog goveda i jakova, ljama i alpaka dok se u divljih preživača afričkog kontinenta uglavnom ne ispolje klinički znakovi (MACLACHLAN i sur., 2009.; RAO i sur., 2020.; MEYER i sur., 2009.; HENRICH i sur. 2007.). Zabilježeni su pobačaji i uginuća pasa (LEVINGS i sur., 1996.) te letargija i uginuća euroazijskih risova držanih u zoološkom vrtu (JAUNIAUX i sur., 2008.).

2.8. Patološke promjene

Na vrstu i jačinu patoloških promjena koje možemo naći tijekom razudbe utječe niz čimbenika kao što su težina kliničke slike, stadij bolesti u kojem je životinja uginula, serotip virusa, individualna i pasminska prijemljivost te prisutnost, vrsta i intenzitet sekundarnih infekcija (ERASMUS, 1975.).

Na sluznici gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta (usne šupljine, jednjaka i predželudca) te gornjih dišnih putova u ovaca vidljivi su edem, krvarenje, erozije i ulceracije (DARPEL i sur., 2007.; MACLACHLAN i sur., 2009.). Područje oko nosa prekriveno je ulceracijama i često začepljeno sivo-smeđim sasušanim krastama sastavljenim od oljuštenog epitela, eksudata i seruma, a na njušci su prisutne ekzorijacije (ERASMUS, 1990.). Koža oboljele životinje je hiperemična, što je osobito vidljivo na područjima koja nisu obrasla vunom (uška, njuška, krunski rub papka), a u potkožju se mogu naći petehijalna krvarenja (MACLACHLAN, 2004.). Limfni čvorovi, osobito retrofaringealni, submandibularni i preskapularni, su izrazito povećani, edematozni i s krvarenjima. Slezena je povećana, povremeno uz nalaz subkapsularnih petehijalnih krvarenja. U uginulih životinja uočava se jaka degeneracija i nekroza tjelesne muskulature. Mišići gube pigmentaciju, a međumišićne fascije su infiltrirane bistrom tekućinom zbog čega potkožno tkivo poprima želatinozni izgled. Nekroza srčanog mišića (osobito papilarnih mišića lijeve klijetke), petehijalna do ekhimotična krvarenja na bazi tunike medije pulmonalne arterije i krvarenje u dnu aorte smatraju se patognomoničnim lezijama (DARPEL i sur., 2007.; MACLACHLAN i sur., 2009.; MANI, 2020.). Pluća su hemoragična, edematozna, povećana i teška. Prisutan je enteritis. Bubrezi su punokrvni, a petehijalna krvarenja nalaze se u žučnom mjehuru, sluznici mokraćnog mjehura, uretri, vulvi i ovojnici penisa (ERASMUS, 1990.). (Slika 14.)



Slika 14. Krvarjenja uočena u različitim organima (A) sluznica usta, (B) jezik, (C) preskapularni limfni čvor i (D) plućna arterija (Izvor: VERONESI i sur., 2020.)

Ovisno o stupnju gravidnosti u manjem broja ovaca infekcija može izazvati smrt ploda i mumifikaciju. U pobačenih plodova tad možemo naći kongenitalne anomalije vezane uz deformacije skeletnog sustava i encefalopatije (ERASMUS, 1975.; PARSONSON i sur., 1994.).

2.9. Dijagnostika

Sumnja na BPJ postavlja se na temelju epizootiološkog, kliničkog ili patološkog nalaza, dok se objektivna dijagnoza može postaviti uporabom različitih seroloških, molekularnih ili viroloških metoda. One su usmjerene na dokaz uzročnika (virusa) ili prisustva specifičnih protutijela, a njihov odabir ovisi o cilju kojeg želimo postići (ANDERSON i sur. 1989.; AFSHAR, 1994.;

ROJAS i sur. 2019.; SAMINATHAN i sur. 2020.; ANONYMOUS, 2021.). (Tablica 1.).

Tablica 1. Metode laboratorijske dijagnostike BPJ (Izvor: ANONYMOUS,2021. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETONGUE.pdf)

Dijagnostička metoda	Namjena					
	Stjecanje statusa populacije slobodne od bolesti	Individualna životinja slobodna od infekcije prije premještanja	Iskorjenjivanje bolesti	Potvrda kliničkog slučaja bolesti	Nadziranje-prevalencija	Cijepljenje – imuni status životinje
Dokaz uzročnika²						
RT-PCR u stvarnom vremenu	-	+++	-	+++	++	-
Klasični RT-PCR	-	+++	-	+++	++	-
Izdvajanje virusa	-	+++	-	+++	-	-
Dokaz specifičnih protutijela						
c-ELISA (specifična za serogrupu)	+++	+++	++	-	+++	++
VN test (specifična za serotip)	+	+	++	+	++	++
AGID	+	+	+	-	+	+

Legenda:

+++ = preporučeno

++ = preporučeno, ali ima ograničenja

+ = prikladno u vrlo ograničenim okolnostima

- = neprikladno

RT-PCR = lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

c-ELISA = kompetitivni imunoenzimni test;

VN = neutralizacija virusa;

AGID = agar gel imunodifuzija

2.9.1. Dokaz uzročnika BPJ

Klinički uzorci u kojim dokazujemo prisustvo virusa uključuju punu krv ili krvni ugrušak suspektno viremičnih životinja, te uzorke slezene i limfnih čvorova uginulih životinja. Virus možemo dokazati i u prikupljenim inficiranim komarčićima.

2.9.1.1. Izdvajanje virusa

Do danas, klasične metode izdvajanja virusa jedine su metode kojima se može sa sigurnošću dokazati prisustvo infektivnog virusa u životinji. Zbog povezanosti virusa BPJ sa eritrocitima, najbolji i najčešći uzorak je puna krv viremične životinje. Kao antikoagulans možemo koristiti heparin, etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) ili natrijev citrat (AFSHAR, 1994.; ROJAS i sur., 2019.).

U slučajevima kada se uzorci uzimaju nakon smrti životinje najbolje je uzorkovati slezenu i limfne čvorove, no virus se može dokazati i u brojnim drugim tkivima primjerice plućima, jetri i koštanoj srži uginulih životinja ili pobačenih plodova, sjemenu ili iz lezija sa sluznica probavnog, dišnog i krvožilnog sustava (AFSHAR, 1994.; KIRKLAND i sur., 2004.; ROJAS i sur., 2019.).

Za izdvajanje virusa i njegovu replikaciju koristimo embrionirana kokošja jaja (ECE) ili stanične kulture kao što je *Culicoides* stanična linija - KC (stanična linija izvedena iz *C. sonorensis*). Dokazano je da je stanična linija KC vrlo osjetljiva i s aspekta dobrobiti životinja prihvatljiva jer smanjuje upotrebu embrioniranih jaja. Osim toga upotrebi su i stanične kulture sisavaca BHK-21 (eng. Baby hamster kidney), Vero (eng. African green monkey kidney) i stanična C6/36 izdvojena iz insekta *Aedes albopictus* (ANONYMOUS, 2021.).

2.9.1.2. Identifikacija virusa

Nakon izdvajanja, virus je potrebno identificirati i serotipizirati, što se uglavnom provodi uporabom molekularnih i/ili seroloških metoda (AFSHAR, 1994.). Od seroloških metoda

najčešće se rabe imunoenzimni test za dokaz antigen, direktna imunofluorescenca i imunoperoksidazni test. Virus BPJ karakterizira interakcija s drugim antigeno sličnim virusima, posebice virusom konjske kuge i epizootske hemoragijske groznice. Kako bi se izbjegla moguća unakrižna reakcija koriste se monoklonska protutijela. Antigenska odrednica za diferencijaciju vrsta virusa tj. seroloških skupina među *Orbivirusima* je protein VP7, dok je VP2 specifičan za serotip.

2.9.1.2.1. Određivanje serološke skupine

Izolati *Orbivirusa* serološki su grupirani na temelju njihove aktivnosti sa specifičnim standardnim antiserumom za protein VP7. Za tipizaciju do razine serološke skupine najčešće se koriste imunoenzimni test, imunofluorescencija odnosno imunoperoksidazni test.

2.9.1.2.2. Određivanje serotipa

Virus neutralizacijski test zlatni je standard odnosno referentna metoda kojom određujemo serotip virusa BPJ. Izvodi se na staničnim kulturama u mikrotitracijskim pliticama. Postupak se temelji na sprječavanju umnožavanja virusa specifičnim protutijelima. Potpuna neutralizacija virusa očituje se izostankom umnažanja virusa te posljedično izostankom citopatogenog učinka (CPU) ili inhibicije plaka. Inhibicija virusa i izostanak CPU indikativni su za specifični serotip virusa BPJ (AFSHAR, 1994.; ROJAS i sur. 2019.; ANANIMOUS, 2021.). Najveća prednost testa je njegova sposobnost da ne izaziva križne reakcije s drugim serološkim skupinama *Orbivirusa*. Zbog svoje visoke osjetljivosti rabi se i za kontrolu imunog statusa životinja nakon cijepljenja. Nedostatak testa je vezan uz zahtjevnost izvođenja metode te potrebno posjedovanje referentnih seruma za sve poznate serotipove virusa BPJ.

2.9.1.3. Molekularne metode

2.9.1.3.1. Dokaz nukleinske kiseline

Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) primjenjuje se od 1989. godine (GOULD i sur., 1989.) i smatra se visoko osjetljivom i specifičnom metodom dijagnostike. Ovom metodom dokazujemo prisustvo specifičnog odsječka virusnog genoma u uzorcima krvi, sperme i tkiva zaraženih domaćih i divljih životinja te u uzorcima komarčića roda *Culicoides* (SAMINATHAN i sur., 2018., 2020.). Metoda se izvodi u znatno kraćem vremenu nego što je potrebno za izdvajanje virusa. Ipak kod interpretacije rezultata treba biti oprezan obzirom da ovom metodom možemo dokazati vrlo male količine virusne RNK odnosno virusa koji nije vijabilan i ne može više uzrokovati infekciju niti u preživača niti u komarčića. Ovom metodom moguće je dokazati i cjepni soj iz atenuiranih cjepiva.

Postoji mnogo različitih molekularnih testova primjerice ugniježđeni konvencionalni RT-PCR ili pak RT-PCR u stvarnom vremenu koje koriste različite metode ekstrakcije, transkripcije, ampifikacijske enzime, početnice i uvjete. Ugniježđeni konvencionalni RT-PCR koji rabi početnice za umnažanje NS1 segmenta (KATZ i sur., 1993.) u uporabi je već 20-ak godina, može se rabiti za dokaz serotipova 1-24 i 26. Ovaj je protokol iznimno koristan ukoliko laboratoriji nemaju kapaciteta za izvođenje RT-PCR u stvarnom vremenu koji ipak ima nekoliko dodatnih prednosti. RT-PCR u stvarnom vremenu može otkriti sve poznate serotipove virusa BPJ, osjetljivost mu je jednaka ili čak bolja, može kvantificirati količinu virusa u uzorku bez rizika od kontaminacije koja je opisana u ugniježđenih RT-PCR metoda. Jedan od poznatijih i najčešće korištenih RT-PCR protokola u stvarnom vremenu razvili su Hofmann i sur. (2008.). Ovaj protokol se temelji se na primjeni Taq man proba i PCR protokola sa ciljnim odsječkom genoma u nukleotidnom slijedu koji kodira za glikoprotein NS3.

Razvoj molekularnih testova, novih tehnologija sekvenciranja, genotipizacije i softvera za fenotipizaciju omogućio je identifikaciju sve većeg broja novih serotipova kao i razlikovanje

virusa ovisno o geografskom području. Isto je značajno utjecalo na razvoj epidemioloških studija u odnosu na geografsku proširenost i podrijetlo izolata virusa.

2.9.1.3.2. Sekvencioniranje nukleinskih kiselina

Molekularna identifikacija serotipa i genotipa virusa BPJ može se odrediti različitim PCR metodama, no za konačnu nedvosmislenu identifikaciju potrebno je provesti sekvencioniranje genoma. Najčešće se radi o umnažanju pojedinih segmenata, njihovom sekvencioniranju i filogenijskoj analizi, no u zadnje vrijeme sve se više koriste i sekvencioniranja čitavog genoma. Ipak, još uvijek relativno visoki troškovi povezani sa sekvencioniranjem ograničavaju njenu primjenu u rutinskoj dijagnostici (ANONYMOUS, 2021.).

2.9.2. Dokaz specifičnih protutijela

Serološkim pretragama dokazujemo prisustvo specifičnih protutijela za virus BPJ, koja nalazimo u životinja koje su bile izložene virusu, cijepljenih životinja i u mladunčadi koja još uvijek posjeduju majčinska protutijela. Serološki odgovor javlja se 7-14 dana nakon infekcije, a četverostruki porast titra u parnim serumima dokaz je akutne infekcije (AFSHAR, 1994.). Inficirane životinje stvaraju neutralizacijska, ali i druga specifična protutijela koja možemo dokazati brojnim serološkim metodama koje se razlikuju u svojoj osjetljivosti i specifičnosti. U životinja koje prethodno nisu bile izložene virusu BPJ, neutralizirajuća protutijela specifična su za serotip virusa koji je izazvao infekciju. Višestruke infekcije s različitim BTV serotipovima dovesti se će do proizvodnje protutijela sposobnih neutralizirati i serotipove kojima životinja nije bila izložena (HASSAN i ROY, 1999.; ROY, 1992.; MACLACHLAN, 2004.; SCHWARTZ-CORNIL i sur., 2008.).

Serološke metode za otkrivanje virusa BPJ mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije ovisno o tome da li su usmjerene na serološku skupinu (glavna odrednica specifičnosti serološke skupine su razlike na proteinu VP7) ili na serotip (determiniran proteinom VP2). Gel difuzijski

precipitacijski test (GDP test) i imunoenzimni test (ELISA) najčešće su korištene metode za određivanje serološke skupine, dok se serum neutralizacijski test najčešće koristi za identifikaciju serotipa.

2.9.2.1. Kompetitivni imunoenzimni test (cELISA)

Kompetitivni imunoenzimni test (c-ELISA) najčešće se koristi za detekciju i kvantifikaciju protutijela u serumu preživača (AFSHAR i sur., 1992.; AFSHAR, 1994.; ROJAS i sur., 2019.; SAMINATHAN i sur., 2020.; ANONIMOUS, 2021.). Prednosti ove metode su što ne dolazi do unakrižnih reakcija s drugim skupinama unutar roda *Orbivirus* te što se može se primijeniti za dokaz protutijela u serumu svih životinjskih vrsta (AFSHAR i sur., 1989.). Visoka specifičnost posljedica je uporabe monoklonskih protutijela specifičnih za serološku skupinu. Iako posjeduju različita svojstva ili specifičnosti epitopa, čini se da se sva ova monoklonska protutijela vežu na amino-terminalnu regiju proteina VP7. Metoda je osjetljiva, specifična, pouzdana, brza i jeftina. Od strane OIE-a propisana je kao referentna metoda serološke dijagnostike BPJ koja je primjenjiva u programima nadzora BPJ ili kontrole cjepnog statusa populacije. Glavni nedostaci metode su lažno negativni rezultati i unakrižna reaktivnost između serotipova (HAMBLIN, 2004.; SAMINATHAN i sur., 2020.).

2.9.2.2. Virus neutralizacijski test

Virus neutralizacijski test kao serološka metoda upotrebljava se za identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih neutralizacijskih protutijela. Poseban značaj ima kao dodatni test u endemskim područjima na kojima je prisutno više od jednog serotipa jer upravo sposobnost identifikacije serotipa ima važnu ulogu u određivanju mjera kontrole bolesti, posebice cijepljenja. Glavna prednost metode je visoka specifičnost i osjetljivost, mogućnost određivanja serotipa odgovornog za infekciju te izostanak križnih reakcija s drugim serološkim skupinama roda *Orbivirus*. Rabi se u svrhu procjene imunog statusa individualne životinje ili populacije

nakon cijepljenja. Nedostaci metode vezani uz duže vrijeme izvođenja kao i činjenicu da za njegovo provođenje laboratorij mora posjedovati referentne sojeve virusa za svaki serotip.

Neutralizirajući titar protutijela određuje se kao recipročna vrijednost serumskih razrjeđenja koja sprečavaju pojavu citopatogenog učinka. Smatra se da je ispitivani virus serološki identičan standardnom BPJ serotipu ukoliko su u testu oba neutralizirana u sličnoj mjeri.

2.9.2.3. Gel difuzijska precipitacija (GDP)

Najznačajnija primjena gel-difuzijske precipitacije u prošlosti bila je vezana za pretraživanje životinja radi prometa. Iako jednostavan za izvođenje, zbog manjka specifičnosti pri razlikovanju protutijela za virus BPJ u odnosu na druge orbiviruse danas više nije u rutinskoj primjeni.

2.10. Diferencijalna dijagnostika

Ovisno o kliničkoj slici, vrsti životinje i epizootiološkim podacima, diferencijalno dijagnostički potrebno je isključiti i druge zarazne bolesti kao što su slinavka i šap, kuga malih preživača, ovčje i kozje boginje, vezikularni stomatitis, zarazni ektim ovaca, groznicu Riftske doline, nairobijsku bolet ovaca, bolest vodenog srca, zaraznu šepavost janjadi, zaraznu koricu goveda i govedu kugu. Od nezaraznih uzroka u obzir dolazi fotosenzibilizacija uzrokovana trovanjem određenim biljkama (JUKIĆ, 2003.; ANONYMOUS, 2021.).

2.11. Liječenje, kontrola i preventivne mjere

2.11.1. Liječenje životinja oboljelih od bolesti plavog jezika

Ne postoji specifična antivirusna terapija za životinje oboljele od BPJ. Potporna terapija uključuje zbrinjavanje oboljelih životinja (prilagodba načina držanja i hranidbe), terapiju

sekundarnih infekcija te, ako je opravdano, primjenu nesteroidnih protuupalnih lijekova (MELLOR, 2002.; SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011.).

Potrebno je poduzeti mjere kojima će se smanjiti pobol i pomor među osjetljivim vrstama preživača kako bi ekonomske posljedice proizvođačima i gospodarstvu bile što manje (EFSA, 2017.).

2.11.2. Preventivne mjere na gospodarstvima

Kako je BPJ nekontagiozna bolest te se ne širi direktnim kontaktom, mjera izdvajanja oboljelih od zdravih životinja na razini stada nije učinkovita već bi opće mjere trebale biti usmjerene na sprječavanje kontakta između domaćina i vektora.

Novom Uredbom (EU) 2016/429 Europskog parlamenta i vijeća od 9. ožujka 2016. o prenosivim bolestima životinja te o izmjeni i stavljanju izvan snage određenih akata u području zdravlja životinja („Zakon o zdravlju životinja”) BPJ (serotipovi 1–24) je kategorizirana kao bolest kategorije C (ANONYMOUS, 2021.) Takva kategorizacija označava bolest koja je relevantna za neke države članice EU i za koju je, u svrhu sprječavanja širenja u područja Europske Unije službeno slobodna od bolesti ili u kojima se provode programi iskorjenjivanja, potrebno provoditi određene mjere. Navedena kategorizacija BPJ podrazumijeva i promjenu strategije kontrole te bolesti jer je do travnja 2021. godine bilo propisano njezino hitno iskorjenjivanje (ANONYMOUS, 2021.). Nova politika kontrole BPJ u Europskoj uniji temelji prvenstveno na cijepljenju ciljne populacije životinja te aktivnostima kao što su nadziranje, provedba mjera kontrole bolesti, nadziranje premještanja životinja i zametnih proizvoda, smanjivanje izloženosti vektorima te transparentnoj razmjeni epizootioloških podataka.

Uredba (EU) 2016/429 („Zakon o zdravlju životinja”) definira područja na kojima se primjenjuju određene mjere kontrole kao:

- a) „zону ograničenja” u kojoj se primjenjuju ograničenja premještanja određenih životinja ili proizvoda te druge mjere za suzbijanje bolesti u cilju sprečavanja širenja na područja gdje se ograničenja ne primjenjuju; zona ograničenja može, prema potrebi, obuhvaćati zone zaštite i nadzora;
- b) „zonu zaštite” kao zonu oko područja izbijanja bolesti, koja uključuje i područje izbijanja bolesti te u kojoj se primjenjuju mjere za suzbijanje bolesti kako bi se spriječilo širenje bolesti iz te zone;
- c) „zonu nadzora” kao zonu koja je uspostavljena oko zone zaštite te u kojoj se primjenjuju mjere za suzbijanje bolesti kako bi se spriječilo širenje bolesti iz zone zaštite.

Zabrana premještanja preživača kao i prometa zametnih proizvoda (sjemena, jajnih stanica i zametaka) iz zone ograničenja, zone zaštite i po potrebi zone nadzora može ograničiti širenje BPJ između država ili područja unutar zemlje posebice kad je isto kombinirano s cijepljenjem prijemljivih preživača kao i odgovarajućim programom nadzora cirkulacije virusa BPJ. Strategija kojom se djelovalo na smanjenje cirkulacije virusa i vektora u okolišu uz masovno cijepljenje prijemljive populacije preživača pokazao se učinkovitim u zemljama južne Europe. Primijenjene mjere značajno su smanjile širenje bolesti prema sjeveru. Tu tezu u svojem mišljenju o kontroli, nadziranju i premještanju životinja u slučaju infekcije virusom BPJ iz 2017. godine EFSA navodi kao ključnu za uspjeh iskorjenjivanja BPJ (CAPORALE i GIOVANNINI, 2010.; EFSA, 2017.).

Kod bolesti prenosivih vektorima usmrćivanje životinja metodom „*stamping-out*“ je nesvršishodno (virus je prisutan u populaciji vektora, te uklanjanje zaraženih životinja nema učinka). Iznimno, ako životinje zbog izraženih kliničkih znakova pate te im je narušena dobrobit, usmrćivanje se kao mjera određuje u skladu sa propisima iz područja zaštite životinja. Zbrinjavanje lešina zaraženih životinja te ostalih nusproizvoda mora biti provedeno na

odgovarajući način kako bi se spriječilo moguće širenje alimentarnim putem, a koje dokazano samo u nekih vrsta mesojeda (EVERMANN, 2008.; JAUNIAUX i sur., 2008.).

Vektore BPJ u prirodi nije moguće u potpunosti suzbiti pa se mjerama koje se primjenjuju nastoji smanjiti njihov broj (MERTENS i MELLOR, 2003.). Postoji više postupaka suzbijanja komarčića, a najbolji učinak imaju ukoliko su primijenjeni u kombinaciji (MELLOR i WITTMANN, 2002.). Individualna primjena insekticida ili repelenata ne smanjuje prijenos virusa zato što se u terenskim uvjetima teško postiže njihova potrebna koncentracija, čak i u onim slučajevima kad je ova mjera provediva. Obzirom na dnevnu aktivnost vektora, zadržavanje životinja u stajama u vrijeme njihove najveće aktivnosti (sumraka i zore) kao i korištenje zaštitnih mreža na prozorima i vratima koje ne propuštaju komarčiće ili su čak impregnirane insekticidom pokazalo se učinkovitijom preventivnom mjerom (MELLOR i WITTMANN, 2002.; EFSA 2017.a). No, u praksi se kontrola komarčića roda *Culicoides* na razini gospodarstva neadekvatno primjenjuje i većinom je zbog tehničkih razloga i okolišnih uvjeta nepraktična. U obzir dolazi primjena mehaničkih, kemijskih, bioloških, genetičkih i biotehnoloških mjera. U znanstvenom izvješću od 2017. godine EFSA je zaključila da nema dokaza o izravnoj učinkovitosti tretiranja okoliša insekticidima te da je isto vjerojatno neučinkovito zbog ubikvitarnih karakteristika komarčića roda *Culicoides*. Insekticide bi trebalo simultano primijeniti na životinju i okoliš kako bi njihova djelotvornost bila što učinkovitija (SCHMAHL i sur., 2009.a, 2009.b.; SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011.). U svrhu suzbijanja komarčića rabe se sredstva niske toksičnosti za sisavce kao što su sintetski piretroidi (SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011.), ivermektin apliciran intradermalno ili subkutano te repelenti za izravnu zaštitu životinja kao što je di-etil toluamid (DEET) koji uspješno odbija komarčiće 4 sata od primjene (TWEEDLE i MELLOR, 2002.). Zadiranje u staništa vektora te uništavanje mjesta njihovog razmnožavanja predstavlja jednu od osnovnih biosigurnosnih mjera. Kako se većina komarčića razmnožava u izmetinama i u vlažnom tlu, pravilnim

održavanjem staja, okoliša gospodarstva i pašnjaka smanjuje se broj mjesta za njihovo razmnožavanje (MERTENS i MELLOR, 2003.).

2.11.3. Cijepljenje protiv bolesti plavog jezika

Cijepljenje se smatra poželjnom i učinkovitom mjerom kontrole BPJ čiji se pozitivan učinak očituje u smanjenim izravnim i neizravnim gubitcima, smanjenju cirkulacije virusa, iskorjenjivanju BPJ iz određenih područja te omogućavanju nesmetanog premještanja životinja. Zbog serološke heterogenosti virusa te izostanka unakrižne imunosti između različitih serotipova, pri odabiru odgovarajućeg cjepiva neophodno je poznavati epizootiološku situaciju na određenom geografskom prostoru. Trenutno su na tržištu dostupna atenuirana i inaktivirana cjepiva.

2.11.3.1. Živa oslabljena (atenuirana) cjepiva

Atenuirana cjepiva izazivaju dobar imunitet nakon samo jedne aplikacije i njihova proizvodnja nije skupa. Zabrinutost vezana uz primjenu ovih cjepiva vezana je uz činjenicu da njihova primjena može rezultirati pojavom kliničkih znakova bolesti, pobačajima, padom mliječnosti, lošom kvalitetom sjemena i malformacijama ploda (VERONESI i sur., 2005.; BHANUPRAKASH i sur., 2009.). Poseban problem predstavlja rizik od moguće rekombinacije cjepnog soja virusa s divljim sojem i možebitni nastanak novog soja visoke virulencije (MELLOR i WITTMANN, 2002.; SAVINI i sur., 2008.; NOMIKOU i sur., 2015.). Atenuirana cjepiva svoju primjenu uglavnom nalaze na području Afrike, te su tijekom više od 50 godina polivalentna atenuirana cjepiva bila jedina komercijalno dostupna cjepiva u endemskim područjima Afrike u kojima je istovremeno cirkuliralo više različitih serotipova virusa BPJ. Atenuirana cjepiva u ograničenom opsegu bila su u uporabi i u nekoliko drugih zemalja, uključujući Sjedinjene Američke Države, Italiju, Bugarsku, Izrael, Francusku na području Korzike i Španjolsku (ALPAR i sur., 2009.).

2.11.3.2. Inaktivirana cjepiva

Inaktivirana cjepiva sadrže umrtvljeni virus te je njihova primjena u potpunosti sigurna. Ako su pravilno proizvedena, stvaraju dobar i dugotrajan imunitet. Iako im je proizvodnja skupa, zbog sigurnosnih razloga na području Europske Unije predstavljaju cjepiva primarnog izbora. U početku su se proizvodila samo monovalentna inaktivirana cjepiva, no danas se ista proizvode u polivalentnom obliku te se kombinacije serotipova u cjepivu mogu prilagođavati sukladno epizootiološkoj situaciji i potrebama na terenu. Nedostatak njihove primjene vezan je uz skupu proizvodnju te višekratnu aplikaciju potrebnu za stvaranje odgovarajućeg imuniteta (SAMINATHAN i sur. 2020.; ANONYMUS, 2021.).

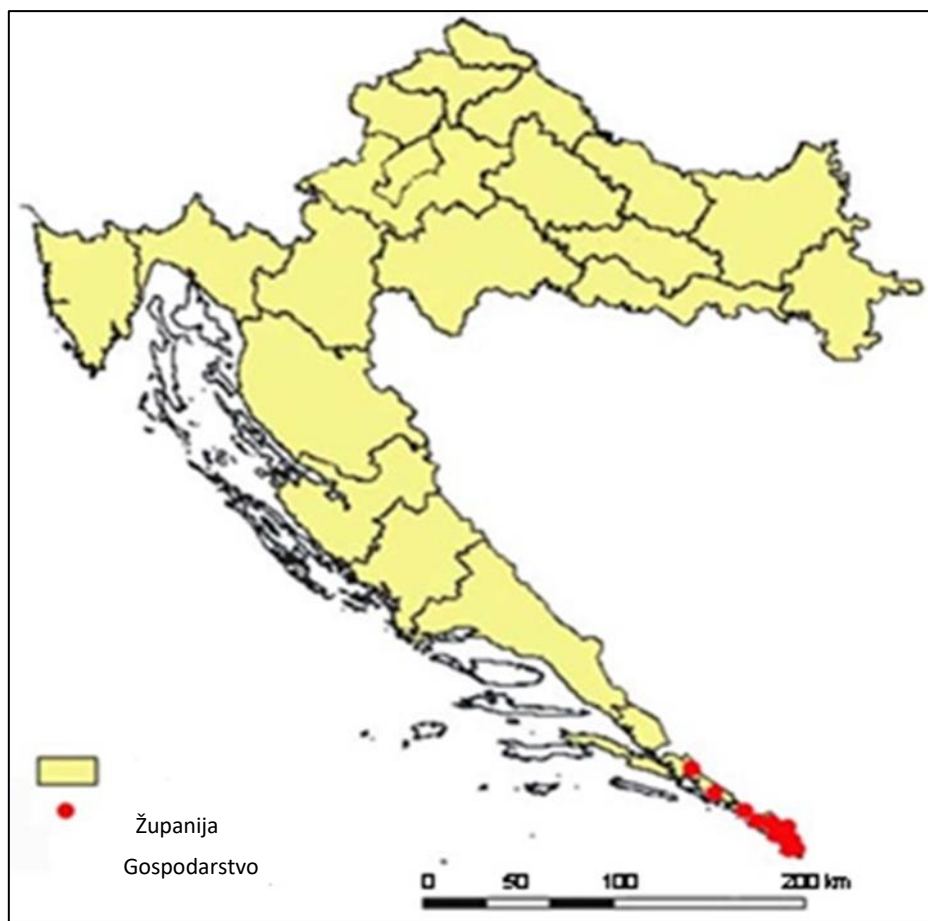
2.11.3.3. Nove generacije cjepiva

Razvoj novih vrsta cjepiva, kao što su rekombinantna vektorska ili podjedinčna cjepiva, zasniva se na poboljšanju učinkovitosti cjepiva u vidu sprječavanja infekcije te bržeg stjecanja imuniteta. No zbog značajno skuplje proizvodnje u odnosu na postojeće vrste cjepiva ista nisu u komercijalnoj primjeni (SPERLOVA i ZENDULKOVA, 2011.; VAN RIJN, 2019.).

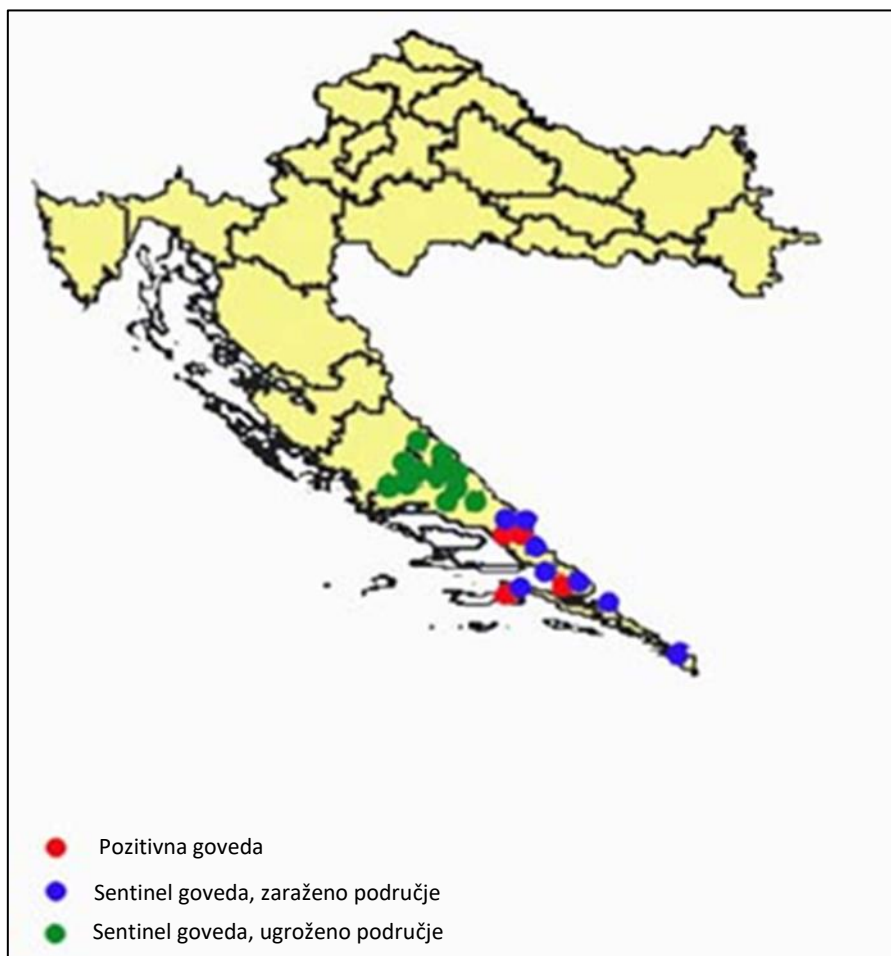
2.12. Bolest plavog jezika u Republici Hrvatskoj

U Hrvatskoj je BPJ prvi put zabilježena u studenom 2001. godine, kada je laboratorijskim pretragama dokazana cirkulacija virusa BPJ serotipa 9 na području Dubrovačko-neretvanske županije. Sumnja je postavljena na temelju kliničkih znakova BPJ koji su uočeni u ovaca sa područja Konavala. Klinički znakovi uključivali su pojačano slinjenje, edem međuviličnog područja, jezika i obraza, erozije sluznice usta, povišenu tjelesnu temperaturu, zacrvenjeli krunski rub papka i šepanje te sporadične pobačaje u ovaca u kasnoj fazi gestacije. Osim na području Konavala, BPJ je tijekom te epizootije zabilježena i na području Dubrovnika te Dubrovačkog primorja. Ukupni pobol je u ovaca iznosio 5,2 %, a pomor 2,29 %. Tri slučaja

BPJ s kliničkim znakovima sličnim u ovaca, no blažeg tijeka, zabilježeni su u koza, dok u goveda nisu primijećeni znakovi BPJ. Istovremeno je najviša seroprevalencija utvrđena u goveda (49,86%), dok je u koza (15,95%) i ovaca (13,72%) ona bila značajno niža. U isto vrijeme cirkulacija serotipa 9 prijavljena je u slučajevima BPJ potvrđenim na području Turske, Grčke, Bugarske, Makedonije, Srbije te Crne Gore. Iz navedenog proizlazi da je unos serotipa 9 u Hrvatsku slijedio istočni krak širenja BPJ po zemljama u mediteranskom bazenu te je unesen zaraženim vektorima ili zaraženim životinjama vrlo vjerojatno iz Crne Gore (LISTEŠ i sur., 2011.). Na temelju zaraženog i ugroženog područja koje je 2001. godine obuhvatilo Dubrovačko-neretvansku i veći dio Splitsko dalmatinske županije izrađen je program praćenja BPJ u 2002. godini. Program se provodio u razdoblju 15. rujna do 15. prosinca 2002. godine, a zasnovan je na nasumično odabranim lokacijama i sentinel životinjama (govedima). Tijekom 2002. godine nije zabilježeno kliničko izbijanje BPJ u niti jedne vrste preživača, Serokonverzija na sentinel životinjama dokazana je na području naselja unutar zaraženog područja, dok na ugroženom području tijekom provedbe programa ona nije utvrđena (Slika 15., Slika 16.). U odnosu na rezultate pretraživanja iz 2001. godine vidljiv je trend širenja virusa BPJ sjeverno, na područja u kojima ranijim pretraživanjima nije bilo dokaza cirkulacije virusa.



Slika 15. Prostorna distribucija stada s utvrđenim kliničkim znakovima BPJ u 2001. godini (Izvor: LABROVIĆ i sur., 2004.)



Slika 16. Prostorna distribucija sentinel goveda u kojih je utvrđena serokonverzija na serotip 9 u razdoblju 14. listopada – 16. studeni 2002. (Izvor: LABROVIĆ i sur., 2004.)

Unatoč vrlo niskoj gustoći populacije goveda u županijama zahvaćenim BPJ, te iako nisu rađena daljnja istraživanja, temeljem dostupnih znanstvenih spoznaja pretpostavljeno je da je virus prezimio u vektorima i/ili govedima (LABROVIĆ i sur., 2004.). Usporedno s programom nadziranja sentinel lokacija na području Dubrovačko-neretvanske i Splitsko-dalmatinske županije provodio se i program entomološkog nadziranja. Provedenim entomološkim istraživanjima dokazano je da je od ukupnog broja identificiranih vrsta komarčića roda *Culicoides* većina pripadala *Obsoletus* kompleksu (92%), te da su *C. obsoletus* i *C. scoticus* najzastupljenije vrste. S obzirom na to da nije dokazano prisustvo *C. imicola*, smatra se da su glavnu ulogu u prijenosu virusa imali *C. obsoletus* i *C. scoticus* (LISTEŠ i sur., 2011.).

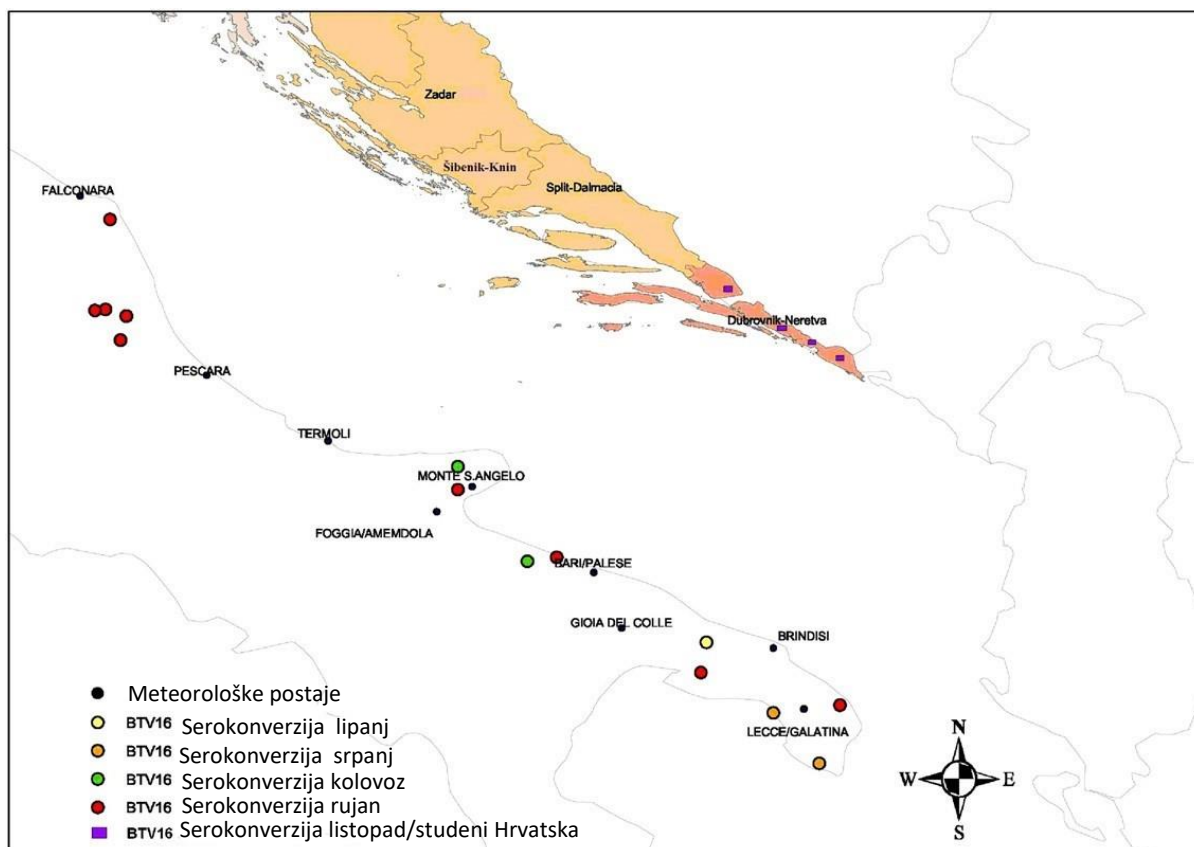
Program nadziranja BPJ od 2002. do 2004. godine bio je koncipiran kroz pasivno i aktivno nadziranje. Pasivno nadziranje je uključivalo obveznu prijavu sumnje na BPJ temeljem kliničkih znakova bolesti i/ili nalaza epidemiološkog istraživanja. Aktivno nadziranje je uključivalo pretraživanje nasumično odabranih sentinel goveda na području visokorizičnih (Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska) županija na način da osigura otkrivanje infekcije uz prevalenciju od najmanje 2% na razini županije i 95 %-tnu pouzdanost. U slučaju da su utvrđeni klinički znakovi BPJ i/ili epidemiološka poveznica, provodilo bi se uzorkovanje prijemljivih vrsta preživača za molekularno pretraživanje. Ako bi se sumnja na BPJ postavila temeljem dokazane serokonverzije, provodio bi se klinički pregled i epidemiološko istraživanje gospodarstva. Seropozitivne životinje ponovno bi bile laboratorijski pretražene i to serološki i molekularno. Klinički pregled životinja u sumnjivom stadu i epidemiološko istraživanje u stadima goveda, ovaca i koza, koja su se nalazila u krugu od 20 km od gospodarstva na kojem je prijavljena sumnja na BPJ te dodatne mjere koje su bile vezane uz ograničenja u premještanju životinja, zatvaranje životinja za vrijeme aktivnosti vektora ili dezinsekcije gospodarstva, provodila su se sukladno važećem propisu o mjerama za kontrolu i iskorjenjivanje BPJ.

U slučaju potvrde BPJ, zaraženim područjem definiralo bi se područje u krugu polumjera od najmanje 100 km od gospodarstva na kojemu je utvrđena bolest plavoga jezika, a ugroženo područje u krugu polumjera najmanje 50 km od granice zaraženog područja.

Iako nije bilo novih izbijanja BPJ u Hrvatskoj, novi program nadziranja BPJ uspostavljen od 2004. godine je uz Splitsko-dalmatinsku i Dubrovačko-neretvansku županiju zbog iznimno velike gustoće populacije ovaca proširen i na Zadarsku te Šibensko-kninsku županiju. Nasumično su odabrane sentinel lokacije i sentinel životinje, a program je zasnovan na serološkom i virološkom pretraživanju uzoraka krvi sentinel životinja.

Početkom studenog 2004. utvrđena je serokonverzija u stadu na području Metkovića, a potom i u drugim stadima na području Dubrovačko-neretvanske županije. Serotipizacijom je dokazan

virus BPJ serotip 16, što je ujedno bila i prva potvrda ovog serotipa u Hrvatskoj. Osim u sentinel goveda, serotip 16 utvrđen je i u ovaca i koza, a u nekim stadima utvrđene su miješane infekcije sa serotipom 9 i serotipom 16. Seroprevalencija na razini stada varirala je od 6 do 36%, odnosno 15 do 50% u stadima ovaca i 11 do 42% u stadima koza i miješanim stadima. Pobel je iznosio 34% na razini stada, a u životinja su utvrđeni blagi klinički znakovi BPJ kao što su hiperemija i edem sluznice usta, dispneja, koronitis te iscjedak iz nosa kao najučestaliji znak bolesti. Iako je BPJ serotip 16 utvrđen u istoj županiji kao i 2001. godine BPJ serotip 9, nisu ih karakterizirali isti putevi unosa i širenja. Serotip 16 prijavljen je u Grčkoj 2000. godine bez dokaza o daljnjem širenju van granica zemlje, te nije nikada prijavljen na području zemalja Balkanskog poluotoka. No 2004. godine cirkulacija terenskog i cjepnog soja serotipa 16 zabilježena je u Italiji. Usporedba serotipa 16 izdvojenog u Hrvatskoj s oba serotipa koja su tada cirkulirala u Italiji potvrdila je 100% podudarnost sa cjepnim sojem iz Italije. S obzirom na to da nije bilo prometa živim životinjama između Italije i Hrvatske, a prema podacima o kretanju vjetrova dokazano je kretanje vjetra u smjeru zapad – istok, zaključeno je da je unos ovog serotipa posljedica širenja zaraženih vektora iz smjera Italije vjetrom (Slika 17.). Izrazito blaga klinička slika upućivala je na nisku patogenost serotipa 16 koji je cirkulirao u Hrvatskoj. Zbog kliničke pojave bolesti u životinja uzrokovane cjepnim sojem nadležno tijelo Italije u siječnju 2005. godine obustavilo je primjenu spornog cjepiva (LISTEŠ i sur., 2009.).



Slika 17. Sentinel stada u kojih je dokazana infekcija serotipom 16 na području Hrvatske i Italije u vremenu od lipnja do rujna 2004. Prikaz i položaj meteoroloških postaja s kojih su prikupljeni podatci o vjetru (Izvor: LISTEŠ i sur., 2009.).

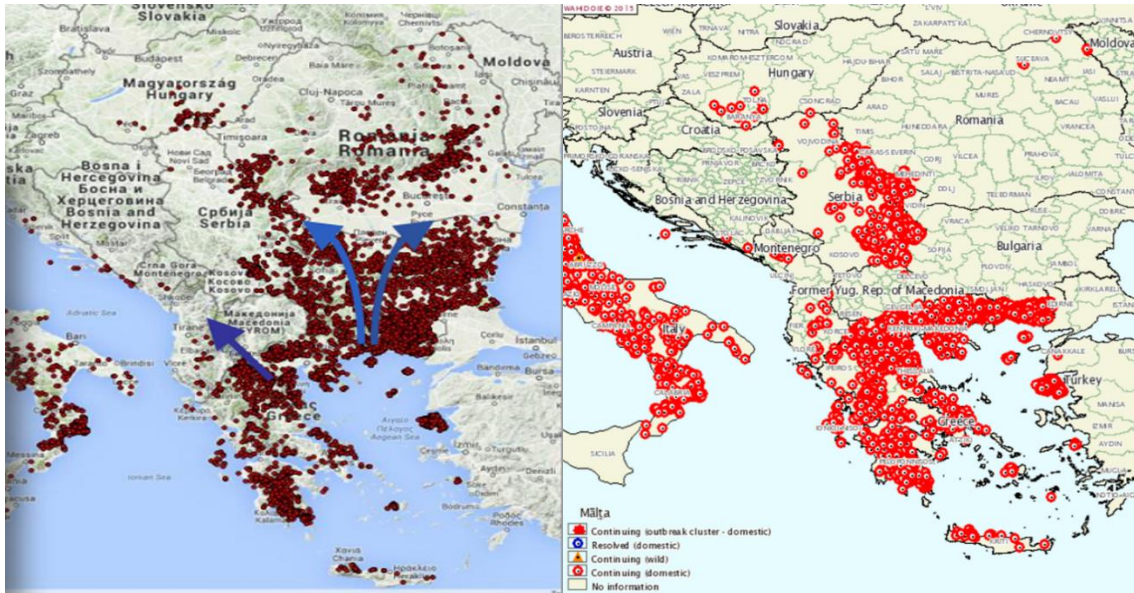
Sve do 2008. godine aktivnim nadziranjem pretraživanje je obuhvaćalo nasumično odabrana sentinel goveda samo na području županija u kojima je u prethodnom razdoblju bio potvrđen BPJ, dok se od 2009. godine program nadziranja širi na sentinel životinje distribuirane na području svih županija.

Osim dva izdvojena slučaja, u razdoblju od 2005. do 2013. u Hrvatskoj nije utvrđena cirkulacija virusa BPJ. Prvi slučaj iz ožujka 2010. vezan je uz deset Oriks antilopa (lat. *Oryx leucoryx*) koje su uvezene iz Omana i smještene na područje otoka Veliki Brijun u Nacionalnom parku Brijuni. Na Brijunu su trebale provesti šest mjeseci karantene, a zatim biti premještene na krajnje odredište u Velikoj Britaniji. U tom razdoblju nije postojala zakonska zabrana uvoza divljih preživača iz Omana u Hrvatsku, ali je isto bilo zabranjeno u Europskoj Uniji. Životinje su smještene u objekte te podvrgnute pretraživanju na BPJ. Serološkim pretraživanjem utvrđena

su protutijela za serotip 1 te serotip 16 virusa BPJ, a isto je potvrđeno i RT-PCR-om. Životinje su početkom travnja vraćene u Oman, a sva daljnja testiranja goveda i ovaca s Brijuna završena s negativnim rezultatima (BOSNIĆ i sur., 2015.). Nakon toga Hrvatska je zabranila uvoz divljih životinja s područja zemalja u kojima su prijavljena izbijanja BPJ. Drugi slučaj s kraja 2010. godine vezan je uz utvrđen serološki pozitivan odgovor na BPJ serotip 8 u manjem broju sentinel goveda u Međimurskoj županiji. Naknadnim pretraživanjima goveda koja su držana na gospodarstvima u krugu od 20 kilometara, nije utvrđen izravni dokaz cirkulacije virusa. Pregledom dokumentacije o podrijetlu i premještanjima goveda dokazano je da se radilo o životinjama uvezenim iz Češke, cijepljenim protiv BPJ cjepivom koje sadrži serotip 8.

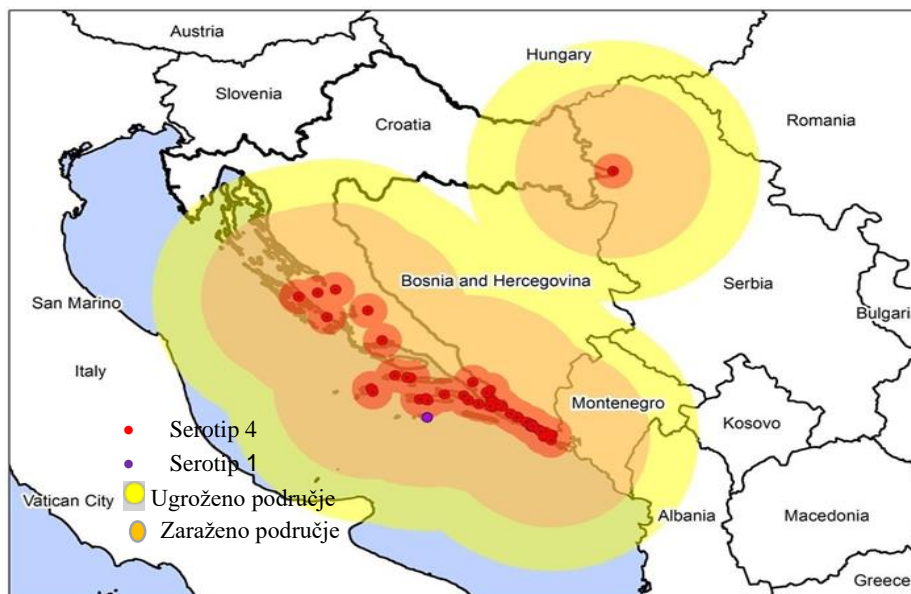
Rezultati višegodišnjeg entomološkog nadziranja provedenog do 2011. godine ukazali su da na području Hrvatske obitavaju vektori BPJ i to komarčići *Culicoides* *obsoletus* kompleksa i *Culicoides* *pulicaris* kompleksa. Niti u jednom pretraženom uzorku do tada nije utvrđen vektor *C. imicola*. Također utvrđeno je da su adultni oblici vektora prisutni u svim županijama, tijekom cijele godine, no smanjene aktivnosti tijekom zime. Najveća aktivnost vektora bilježi se od lipnja do rujna. S obzirom na cjelogodišnju aktivnost vektora nisu postojali odgovarajući uvjeti za proglašenje razdoblja godine slobodnog od vektora. Entomološko istraživanje od 2011. do 2014. godine nije bilo sastavni dio programa nadziranja BPJ i nije se provodilo.

Na području Balkanskog poluotoka, na kojim se BPJ nije pojavila više od 10 godina, 2014. godine dolazi do neočekivane epizootije serotipa 4 (EFSA, 2017.). Prisustvo serotipa 4 prvo prijavljuje Turska, nakon čega u svega nekoliko mjeseci slijede prijave iz Grčke, Bugarske, Albanije, BIH, Makedonije, Srbije, Crne Gore, Rumunjske, Hrvatske i Mađarske (ANONYMOUS, 2020.). (Slika 18.).



Slika 18. Kretanje BPJ serotipa 4 tijekom 2014. – 2015. godine (Izvor: ANONYMOUS, 2015.)

U Hrvatskoj se u listopadu 2014. godine ponovno postavlja prva klinička sumnja na BPJ u stadu ovaca na području Dubrovačko-neretvanske županije, nakon čega 27. listopada 2014. godine slijedi i prva laboratorijska potvrda serotipa 4. Do ožujka 2015. godine cirkulacija ovog serotipa dokazana je i u Splitsko-dalmatinskoj, Šibensko-kninskoj, Zadarskoj i Vukovarsko-srijemskoj županiji. Na otoku Lastovo dokazan je i izdvojen slučaj infekcije serotipom 1. (Slika 19.).



Slika 19. Prikaz potvrđenih slučajeva BPJ u Hrvatskoj sa zonama ograničenja u vremenskom razdoblju od listopada 2014. do lipnja 2015. (Izvor: Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2015.)

Blagi klinički znakovi BPJ uočeni su primarno u ovaca, rjeđe u koza, dok u goveda nije bilo kliničkih slučajeva BPJ. Najučestaliji znak bolesti u ovaca bio je nosni iscjedak, popraćen povišenom temperaturom, općom slabošću životinja, otečenim sluznicama usta, edemom glave i međuviličnog prostora te šepanjem. Cijanoza jezika, koronitis i pobačaj rijetko su zabilježeni. Najučestaliji znakovi bolesti u koza bili su pobačaj, nosni iscjedak i opća slabost.

Zbog naglog širenja bolesti, nepovoljne epizootiološke situacije u susjednim zemljama te indirektnih šteta nastalih ograničenjima u prometu životinja, krajem 2014. godine donesene su odluke o proglašavanju cjelokupnog teritorija Hrvatske jednom epizootiološkom zonom - zaraženim područjem kao i obveznom cijepljenju protiv BPJ svih goveda, ovaca i koza u Hrvatskoj. Mjera cijepljenja provodila se u kontinuitetu od 2015. do 2019. godine primjenom istog cjepiva s inaktiviranim virusom BPJ serotip 4, u rokovima i razdoblju godine kojim se osiguralo stjecanje imuniteta populacije prije očekivane povećane aktivnosti vektora, a koje je pokrivalo razdoblje od siječnja do travnja. Iako je potvrđen slučaj BPJ serotipa 1 na otoku Lastovu, s obzirom na to da nije bilo dokaza o njegovu daljnjem širenju van područja otoka, detekcija ovog serotipa smatrala se izdvojenim slučajem, pa se cijepljenje odgovarajućim cjepivima (cjepiva s serotipom 1) nije provodilo. Troškovi cijepljenja posjednicima su u cijelosti podmireni iz Državnog proračuna, a nabavka cjepiva dodatno je sufinancirana od strane Europske komisije. U odnosu na premještanja životinja proglašavanje cijelog područja zemlje jednom zonom omogućilo je nesmetani promet živim životinjama unutar zemlje, a uvođenje cijepljenja omogućilo nesmetanu trgovinu s drugim državama članicama i trećim zemljama.

U kolovozu 2015. godine započela je i provedba programa nadziranja BPJ s ciljem praćenja cirkulacije serotipa 4 u zemlji i otkrivanja ranog unosa i/ili daljnjeg širenja bilo kojeg drugog serotipa BPJ. S obzirom na zadane ciljeve te epizootiološke podatke o kretanju BPJ u Hrvatskoj i susjednim zemljama, područje zemlje podijeljeno je radi potreba dinamike uzorkovanja na

kontinentalni i obalni dio. Kontinentalni dio uključivao je svih 21 županiju, dok su u obalni dio svrstane samo one županije kojima se dio površine nalazi uz Jadransko more (Istarska, Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska županija). S obzirom na cirkulaciju različitih serotipova BPJ u Italiji, područja tih županija smatrana su visokorizičnim za mogućnost unosa drugih serotipova BPJ, osim serotipa 4.

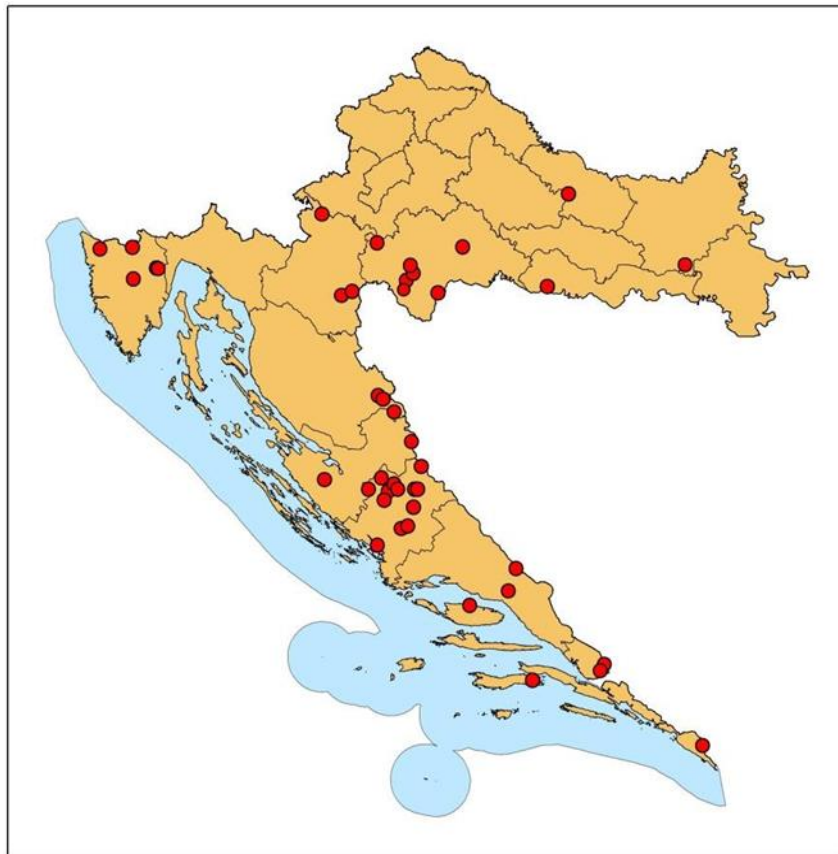
Program se provodio od 1. kolovoza do 30. prosinca 2015. godine, na način propisan Uredbom 1266/2007, tada važećim zakonodavstvom EU. Uzorkovanje se provodilo na nasumično odabranim sentinel životinjama govedima, koja su na dan 15. travnja 2015. godine bila stara tri mjeseca i više te nisu bila cijepljena protiv BPJ. Veličina uzorka izračunata je uzimajući u obzir referentnu geografsku jedinicu od 45 km x 45 km te geografski položaj i izgled zemlje, a u pretraživanje je bilo uključeno ukupno 2000 životinja. Broj uzoraka omogućio je otkrivanje 5%-tne prevalencije, s pouzdanošću od 95% u prijemljivih vrsta na epizootiološki značajnom području. Sentinel životinje odabrane su iz Jedinственog registra domaćih životinja nasumično, a cjepni status provjeravao se u bazi o cijepljenjima. Uzorkovanje se cijelo vrijeme provedbe programa moralo provoditi na istim životinjama, ako su bile dostupne na gospodarstvu.

Za potrebe praćenja cirkulacije virusa BPJ – serotipa 4 u kontinentalnom dijelu zemlje uzorkovanje se provodilo dva puta u zadanim vremenskim razdobljima, i to prvi puta najkasnije do 15. rujna 2015., a drugi puta najranije od 15. studenoga 2015. godine. Učestalija dinamika uzorkovanja određena je radi otkrivanja ranog unosa i/ili daljnjeg širenja bilo kojeg drugog serotipa virusa BPJ, osim serotipa 4, na obalnom dijelu zemlje. Uzorkovanje se provodilo jedan puta mjesečno u razdoblju 01. kolovoza – 30. prosinca 2015. godine na 800 sentinel životinja. U svrhu kontrole razine procijepljenosti populacije tijekom srpnja i kolovoza 2015. godine provodila se i kontrola imuniteta. Stada porijeklom s područja cijele Hrvatske odabrana su nasumično iz registra cijepljenih životinja. Od 2015. godine ponovo se uvodi i program

entomološkog istraživanja populacije komarčića roda *Culicoides*. Utvrđuju se prisutnost i dinamika pojavljivanja komarčića roda *Culicoides*, njihova zemljopisna rasprostranjenost i razdoblja godine od najvećeg rizika za pojavu i širenje virusa BPJ te određuju razdoblja godine tijekom kojih adulti vektora nisu aktivni. Analizom uzoraka utvrđuje se ukupan broj prisutnih odraslih insekata roda *Culicoides*, identificiraju vrste vektora, a molekularnim pretraživanjem vektora moguća cirkulacija virusa. Uzorci insekata sakupljeni su uglavnom u razdoblju od veljače do prosinca, na nasumično odabranim gospodarstvima s govedima, ovcama ili kozama. Jednom odabrano gospodarstvo uzorkovano je tijekom cijelog perioda trajanja programa. Do 2018. godine dinamika uzorkovanja zasnivala se na jednom uzorkovanju mjesečno, a u 2019. uzorci su se prikupljali dva puta mjesečno. Insekti su sakupljeni pomoću lampi hvataljki postavljenih u stajama u kojima preživači (ovce, koze, goveda) borave tijekom noći. Iz sakupljenih uzoraka izdvajani su komarčići roda *Culicoides*. Morfološkom analizom prikupljenih adulta vektora identificirana je vrsta, vektori BPJ i određen je njihov spol. Vrste *Culicoides* koji nisu vektori BPJ prikazani su kao *Culicoides* spp., a one koje nisu identificirane na osnovu morfoloških karakteristika, identificirane su molekularnim metodama (višestrukom lančanom reakcijom polimerazom). Takve analize omogućile su identifikaciju dominantne vrste *Culicoides* u Hrvatskoj kao i prikupljanje dokaza o obitavanju *C. imicola* ili moguće novim vrstama vektora BPJ. Utvrđeni vektori BPJ molekularno su pretraženi radi utvrđivanja cirkulacije virusa bolesti plavog jezika.

Program nadziranja BPJ provodi se u kontinuitetu do danas. Izbijanja BPJ serotipa 4 bilježena su intenzivno na cijelom području zemlje tijekom 2016. godine (Slika 20.), a u siječnju 2017. godine, nakon dvije masovne kampanje cijepljenja, potvrđen je samo jedan (posljednji) slučaj

bolesti.



Slika 20. Prikaz potvrđenih slučajeva BPJ u RH tijekom 2016. godine (Izvor: Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2016.)

Visoka procijepljenost te niska gustoća populacije goveda na određenim područjima utjecala je nakon 2017. godine i na pronalaženje odgovarajućih sentinela te su u zamjenu za goveda korištene koze i ovce.

Temeljem provedenih mjera kontrole i rezultata nadzora u razdoblju 2014. – 2019. godine Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE) usvojila je 29. svibnja 2020. godine samodeklaraciju kojom se Republika Hrvatska proglašava slobodnom od bolesti plavog jezika od 1. siječnja 2020. godine. Samodeklaracija je izrađena u skladu s poglavljem 1.6. i člankom 8.3.3. OIE Priručnika za zdravlje kopnenih životinja.

Unatoč svim provedenim mjerama, vrlo brzo nakon prestanka cijepljenja, već u listopadu 2020. godine BPJ serotip 4 ponovno je potvrđen u RH na području Istarske županije. OIE je temeljem

prijave novih slučajeva označio samodeklaraciju neaktivnom od 15. listopada 2020. godine.

(Slika 21.).



Slika 21. Područja potvrđenih slučajeva BPJ u listopadu 2020. godine (Izvor: ANONYMOUS, 2021.)

Nakon prve potvrde BPJ u Istarskoj županiji do kraja 2020. godine uslijedile su još i prijave iz Dubrovačko-neretvanske i Požeško-slavonske županije.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Zahvaljujući razvoju dijagnostičkih postupaka te istraživanjima u području molekularne epidemiologije danas je poznato da se pojava BPJ te promijene u epizootologiji bolesti podudaraju s klimatskim promjenama koje imaju izravan utjecaj na distribuciju i biologiju vektora te održavanje virusa u ekosustavima. Iako se prijenos virusa ubodom zaraženog komarčića smatra dominantnim načinom prijenosa, postoje dokazi da se neki serotipovi BPJ mogu prenositi i horizontalno, transplacentarno i/ili kolostrumom, no značaj atipičnih načina prijenosa u ekologiji BPJ još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Dodatna istraživanja potrebna su i kako bi se utvrdili mehanizmi prezimljavanja virusa. Naime, ranije se zbog sezonalnog karaktera vektora smatralo da je prijenos BPJ moguć samo za toplijeg doba godine, no izbijanja BPJ na području sjeverne Europe i Kanade upućuju na mogućnost preživljavanja virusa tijekom zimskih mjeseci. Rezultati dostupnih studija ukazuju da divlji preživljači vrlo vjerojatno imaju određenu ulogu u cirkulaciji virusa i održavanju infekcije BPJ u nekom području, posebice ako je gustoća kompetitivne vrste domaćih preživljača niska, no njihova uloga u prezimljavanju virusa još uvijek nije potvrđena.

Uvažavajući čimbenike koji mogu utjecati na širenje i vremensko trajanje bolesti EFSA je 2017. godine izdala revidirano znanstveno mišljenje o najnovijim saznanjima vezanim za epizootiološke značajke BPJ, posebice načine prijenosa iste. Također, temeljem matematičkog modela, izrađena je i procjena najprikladnijeg vremena trajanja kampanje cijepljenja sa svrhom postizanja statusa zemlje ili regije slobodne od BPJ. Provedba kampanje masovnog cijepljenja u trajanju od najmanje 5 uzastopnih godina s 95% razinom procijepljenosti populacije, praćena programom nadziranja kojim se omogućava otkrivanje niske razine prevalencije virusa (manje od 1%) izdvojena je kao jedina učinkovita mjera koja dovodi do iskorjenjivanja BPJ.

Unatoč svim provedenim mjerama zasnovanim na znanstvenim preporukama EFSA-e te obvezama određenim europskim zakonodavstvom, vrlo brzo nakon prestanka cijepljenja u

travnju 2019. godine, već u listopadu 2020. godine virus BPJ ponovno je potvrđen na području nekoliko županija u RH u sentinel životinja, bez prethodne kliničke manifestacije bolesti. Upravo to novo izbijanje BPJ svega 18 mjeseci od prestanka cijepljenja daje naznake da provedba mjera ne može biti generalizirana, već je u planiranju neophodno uzeti u obzir i specifične uvjete područja kao što su gustoća populacije, dinamika kretanja životinja, klimatski čimbenici, ekologija vektora i dostupnost administrativnih resursa te strategiju kontrole i iskorjenjivanja bolesti temeljiti na pristupu „od slučaja do slučaja“.

Uvažavajući navedeno glavni cilj ovog istraživanja usmjeren je na razvoj novog pristupa mjerama kontrole i prevencije BPJ utemeljenog na rezultatima provedene epidemiološke analize. Isto uključuje prospektivno planiranje strategije temeljeno na definiranju ključnih podataka, njihovom prikupljanju, procjeni i integriranju, kao i provjeri postupka kako bi se osiguralo usklađivanje s planom i vodećim načelima, uzimajući u obzir pri tome sve osobitosti ove bolesti u RH.

U svrhu istog određeni specifični ciljevi istraživanja uključili su:

1. utvrđivanje mjera učestalosti
2. utvrđivanje magnitude varijabilnosti seroprevalencije
3. analizu čimbenika rizika
4. prostorno-vremensko mapiranje i analizu procijepljenosti.

Osnovna pretpostavka istraživanja zasnovana je na činjenici da bi pristup provedbi mjera kontrole i prevencije BPJ bio najučinkovitiji kad bi se mjere usmjerile prema hijerarhijskoj razini najveće varijabilnosti. Očekivanja su bila usmjerena na značajnu varijabilnost u cirkulaciji virusa BPJ na razini županija i naselja tijekom različitih faza epizootije koja se mogu povezati s varijabilnosti u prisutnosti vektora, odnosno klimatskim značajkama, gustoćom populacije preživača, te procijepljenosti prijemljive populacije. Također, očekivalo se i da će stopa incidencije biti povezana sa specifičnim klimatskim obilježjima, te da će vjerojatnost

otkrivanja seropozitivnih sentinel životinja u županiji tijekom aktivne faze kontrole epizootije biti u negativnoj asocijaciji s razinom procijepljenosti populacije preživača u županiji.

Nadalje, utvrdila su se ograničenja trenutnog načina prikupljanja i pohrane podataka, te su date preporuke za unaprjeđenje sustava u svrhu provedbe učinkovite epidemiološke analize. Ovako razvijen pristup mogao bi se primijeniti, kao znanstveni temelj, i za planiranje nacionalnih strategija kontrole ostalih vektorskih zaraznih bolesti životinja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Geografsko područje obuhvaćeno istraživanjem

Ovim istraživanjem obuhvaćena su područja svih županija Hrvatske na kojima su tijekom razdoblja od 2014. do 2019. godine provedene mjere kontrole i praćenja kretanja BPJ. Klinička faza epizootije od 27. listopada 2014. do 01. srpnja 2015. godine obuhvaća provedbu mjera na području južnog hrvatskog primorja odnosno području Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske županije, a faza aktivne kontrole infekcije od 01. kolovoza 2015. do 31. prosinca 2019. obuhvaća provedbu mjera na području svih (21) hrvatskih županija.

Suvremena regionalna podjela Republike Hrvatske prikazana je na Slici 22. Republika Hrvatska je zemljopisno smještena u južnom dijelu Srednje Europe te u sjevernom dijelu Sredozemlja. Na sjeveru graniči sa Slovenijom i Mađarskom, na istoku sa Srbijom i Bosnom i Hercegovinom, na jugu s Crnom Gorom, a na zapadu s Italijom ima morsku granicu. Kopnena površina iznosi 56.542 km², a površina obalnog mora 31.067 km². Klima u unutrašnjosti Hrvatske je umjereno kontinentalna, u gorskoj Hrvatskoj pretplaninska i planinska, u primorskom dijelu mediteranska (sa suhim i toplim ljetima te vlažnim i blagim zimama), a u zaleđu submediteranska (s nešto hladnijim zimama i toplijim ljetima). Najvažniji modifikatori klime na području Hrvatske jesu Jadransko i šire Sredozemno more, orografija Dinarida sa svojim oblikom, nadmorskom visinom i položajem prema prevladavajućem strujanju, otvorenost sjeveroistočnih krajeva prema Panonskoj ravnici, te raznolikost biljnog pokrova. Zbog takvog položaja klimatske su prilike povoljne i umjerene bez većih temperaturnih ekstrema. Prema Köppenovoj klasifikaciji gotovo cijelu Hrvatsku karakterizira umjereno topla kišna klima, dok samo najviši planinski krajevi imaju snježno-šumsku klimu, a dalmatinsko priobalje i otoci sredozemnu klimu. Sredozemnu klimu sa suhim i vrućim ljetom

karakterizira kasno jesenski maksimum padalina, dok su ljeta vrlo suha. Prosječna temperatura zraka najtoplijeg mjeseca viša je od 22⁰C, a najhladnijeg viša od 4⁰C. U Hrvatskoj se javljaju različiti vjetrovi od kojih su, posebice na Jadranu, najvažniji bura i jugo (ZANINOVIĆ i sur., 2008.).



Slika 22. Suvremena regionalna podjela Republike Hrvatske (IZVOR: Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.)

4.2. Vremensko razdoblje obuhvaćeno istraživanjem

Istraživanjem su obuhvaćeni podatci o provedbi mjera kontrole i nadziranja BPJ u razdoblju od 2014. do 2019. godine, a koji su radi analize razdvojeni na:

- Kliničku fazu epizootije koja je trajala od 27. listopada 2014. do 01. srpnja 2015. godine,

i

- Fazu aktivne kontrole epizootije koja je trajala od 01. kolovoza 2015. do 31. prosinca 2019. godine.

Put unosa, dinamika kretanja i povezani rizični čimbenici istraženi su tijekom obje navedene faze.

4.3. Izvori podataka korištenih u istraživanju

4.3.1. Podatci o brojnom stanju životinja

Podatci o brojnom stanju goveda, ovaca i koza u RH na razini naselja u razdoblju 01. siječnja 2014. do 31. prosinca 2019. godine, za svaku godinu zasebno, dobiveni su iz Jedinstvenog registra domaćih životinja (JRDŽ). Varijable daju informaciju o geografskom području (županija) i lokaciji podrijetla životinje (naselje i gospodarstvo) te ukupnom broju životinja po vrsti zabilježenu na dan 31. prosinca referentne godine.

4.3.2. Podatci o laboratorijskim pretraživanjima

Obrađeni i analizirani podaci o laboratorijskim pretraživanjima uključuju sva pretraživanja povedena tijekom razdoblja od 27. listopada 2014. do 31. prosinca 2019. godine. Podatci o pretraženim životinjama temeljeni su na individualnoj oznaci životinje pri čemu jedan uzorak predstavlja jednu životinju. Podatci kao što su dob, spol, ili proizvodna namjena životinje nisu uzimani u obzir kao kriteriji od interesa prilikom obrade podataka.

Izvorni podatci uključuju ukupno 21495 opservacija i deset varijabli. Opservacije se odnose na broj individualnih laboratorijskih pretraga načinjenih različitim dijagnostičkim metodama. Varijable daju informaciju o geografskom području (županija) i lokaciji podrijetla uzorka (naselje i gospodarstvo), vrstama pretraženih životinja (govedo, ovca, koza), vremenskom okviru provedenih uzorkovanja kao što su datum postavljanja sumnje na bolest, početak i

završetak laboratorijske pretrage, korištenoj metodi dijagnostike i rezultatima provedenih pretraga (Tablica 2.)

Tablica 2. Varijable vezane uz podatke o laboratorijskim pretragama

Varijabla	Značenje
JIBG	Jedinstveni identifikacijski broj gospodarstva
Županija	Geografsko područje
Naselje	Lokacija podrijetla uzorka
Vrsta	Vrsta životinje
Dat sumnje	Datum prijavljene kliničke sumnje na bolest
Započeto	Datum početka laboratorijske pretrage
Završeno	Datum završetka laboratorijske pretrage
Metoda	Vrsta laboratorijske pretrage
Uzorak	Vrsta uzorka
Rezultat	Rezultat laboratorijske pretrage izražen kao pozitivno ili negativno

Jedinstveni identifikacijski broj gospodarstva (JIBG) jedinstvena je i neponovljiva oznaka gospodarstva sastavljena od najviše 12 znamenki koju za svaku farmu upisanu u Registar farmi JRDŽ-a dodjeljuje ovlaštena pravna osoba. Ista u sebi sadrži podatke o lokaciji (županija, naselje, adresa), posjedniku, proizvodnji te je jedinstvena s obzirom na zemljopisne koordinate lokacije gospodarstva.

Podatci o lokaciji uključuju razinu županije kao osnovnu geografsku jedinicu u Republici Hrvatskoj te naselja unutar županija.

Podatci o laboratorijskim pretraživanjima uzoraka krvi goveda, ovaca i koza na BPJ uključuju rezultate svih laboratorijskih pretraga, a obuhvaćaju:

- rezultate dobivene pretraživanjem 18 930 uzoraka krvi pretraženih imunoenzimnim testom INGENASA BTV COMPAC 2.0 12 BTV.K3 za otkrivanje protutijela specifičnih za virus BPJ osjetljivosti 99,4 % i specifičnost 100%.
- rezultate virus neutralizacijskog testa provedenog na 381 uzorku krvi
- rezultati lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu RT-PCR (HOFMANN i sur., 2008.) dobivene pretraživanjem 2 401 uzorka krvi

Varijable daju informaciju o datumu zaprimanja uzorka u laboratorij te početku i završetku laboratorijske pretrage za svaki individualni uzorak. Rezultat imunoenzimnog testa i RT-PCR testa je izražen kao negativno ili pozitivno, a virus neutralizacijskog testa kao negativno ili pozitivno s navedenim utvrđenim serotipom.

4.3.3. Podatci o kliničkim znakovima bolesti

Podatci o utvrđenim kliničkim znakovima bolesti, grupirani prema vrsti životinje, prikupljeni su iz epidemioloških upitnika provedenih na gospodarstvima u zaraženom i ugroženom području tijekom trajanja kliničke faze epizootije 2014. - 2015. godine te obrazaca prijave sumnji.

Izvorni podatci uključuju ukupno 733 opservacije i 10 osnovnih varijabli. Opservacije se odnose na broj gospodarstava u zaraženom i ugroženom području na kojima su popunjeni epidemiološki upitnici te potvrđena BPJ. Varijable daju informaciju o geografskom području (županija) i lokaciji podrijetla uzorka (naselje i gospodarstvo), brojnom stanju životinja po vrsti, provedbi dezinfekcije, utvrđenim kontaktima, vremenu provedbe epidemiološkog upitnika i utvrđenim kliničkim znakovima bolesti. Podatci o potvrđenim slučajevima BPJ prijavljenim OIE-u i Europskoj Komisiji putem sustava prijave bolesti ADNS prikupljeni su iz arhive

podataka Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede RH. Varijable koje sadrže podatke o lokaciji izbijanja bolesti (županija, naselje, gospodarstvo), te broju sumnjivih, oboljelih i uginulih životinja korištene su u analizi pojave kliničkih znakova bolesti.

4.3.4. Podatci o premještanju živih životinja

Podatci o premještanju živih životinja unutar RH na i iz područja Dubrovačko-neretvanske županije te iz drugih država tijekom 2014. godine dobiveni su iz JRDŽ ekstrakcijom iz Jedinstvenog registra goveda. Varijable daju informaciju o županiji odredišta (polazna i dolazna lokacija), tipu migracije (klanje, daljnji uzgoj), broju migracija i ukupnom broju premještenih životinja.

4.3.5. Podatci o entomološkom istraživanju

Podatci o provedenim entomološkim istraživanjima komarčića roda *Culicoides* korišteni u analizi prikupljeni su u razdoblju od 2015. do 2019. godine te uključuju pet osnovnih varijabli koje sadrže podatke o geografskoj lokaciji (županiji), naselju (lokacija prikupljanja uzorka), datumu uzorkovanja, vrstama vektora, spolu i brojnosti vektora. Podatci su prikupljeni s područja 21 županije, a u analizu je uključeno ukupno 482 317 komarčića roda *Culicoides* izdvojenih iz lampi hvataljki.

Laboratorijska pretraživanja vektora provedena lančanom reakcijom polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu provedena su kako bi se utvrdilo prisustvo virusa BPJ u populaciji vektora. Podatci o rezultatima sadrže četiri varijable s informacijama o geografskoj lokaciji (županija) i naselju, ukupnom broju pretraženih uzoraka te rezultatu pretrage izraženom kao pozitivno i negativno.

4.3.6. Podatci o klimatskim elementima

U obzir su uzeti povijesni podatci Državnog hidrometeorološkog zavoda RH te *Visual Crossing* pružatelja usluge vremenskih podataka (“Powered by Visual Crossing Weather” <https://www.visualcrossing.com>) o klimatskim elementima značajnim za epizootologiju BPJ kao što su temperatura, vlaga, brzina vjetra i oborine. Analizirani su podatci dnevnih mjerenja od 01. lipnja 2014. do 30. lipnja 2015. godine za svaki klimatski čimbenik. Isti podatci korišteni su u svrhu utvrđivanja čimbenika pogodnih za preživljavanje i prezimljavanje vektora u okolišu.

4.3.7. Podatci o cijepljenim životinjama

Podatci o cijepljenju goveda, ovaca i koza u razdoblju 2015. do 2019. godine dobiveni su iz JRDŽ-a, baze VETIs (podatci o cijepljenjima – bolest plavog jezika) Ministarstva poljoprivrede. Varijable daju informaciju o geografskom području (županija) i lokaciji podrijetla životinje (naselje i gospodarstvo), ukupnom broju životinja po vrsti u naselju, ukupnom broju cijepljenih životinja po vrsti na gospodarstvu, vremenskom okviru i broju provedenih cijepljenja (aplikacija prve i druge doze), koordinati gospodarstva i vrsti primijenjenog cjepiva. Tijekom navedenog razdoblja za cijepljenje svih goveda, ovaca i koza korišteno je cjepivo BLUEVAC-4, proizvođača CZ Veterinaria, S.A. (Španjolska) koje je sadržavalo inaktivirani virus bolesti plavog jezika, serotip 4, soj BTV-4/SPA-1/2004. Goveda i ovce cijepljene su tijekom svih pet godina, a koze od 2015. do 2018. godine. Podatci o kontroli cjepnog imuniteta provedenog 2015. godine sadrže varijable koje daju informaciju o županiji, broju stada, broju uzorkovanih preživača, datumu cijepljenja i uzorkovanja te rezultatima pretraživanja izraženima kao ukupno pozitivno i ukupno negativno.

4.4. Definicija slučaja BPJ, stada i kriteriji za uključivanje i isključivanje podataka

Uzimajući u obzir osobitosti kliničke faze epizootije te faze aktivne kontrole epizootije za potrebe ovog istraživanja prvo je trebalo jasno definirati pojmove i grupirati podatke te postaviti kriterije za uključivanje i isključivanje podataka iz analize.

4.4.1. Klinička faza epizootije (od 27. listopada 2014. do 1. srpnja 2015. godine)

Klinička faza epizootije obuhvatila je analizu podataka o mjerama provedenim radi prijave sumnje na BPJ i potvrđenih slučajeva bolesti te čimbenika koji su utjecali na izbijanje bolesti i tijek epizootije.

Za potrebe istraživanja kliničke faze epizootije *sumnja* na BPJ definirana je u dvije razine kao:

- a) *klinička sumnja* što je uključivalo pojavu bilo kojeg kliničkog znaka koji ukazuje na BPJ u prijemljive vrste životinja, ili
- b) *sumnja iz drugih razloga* što je uključivalo postojanje epizootioloških podataka temeljem kojih se može postaviti sumnja na bolest (npr. kontaktna gospodarstva, premještanja životinja, korištenje zajedničkih pašnjaka), ili pozitivan rezultat serološkog pretraživanja uzorka krvi imunoenzimnim testom ELISA bez prethodno utvrđenih kliničkih znakova bolesti.

Potvrđeni slučaj BPJ definiran je kao pozitivan rezultat molekularnog pretraživanja uzorka krvi lančanom reakcijom polimeraze uz prethodnu reverznu transkripciju, bez obzira na pojavu kliničkih znakova bolesti u stadu. Varijabla koja označava pozitivno stado načinjena je kombinacijom vrste životinje i testa, a rezultat potvrđenog slučaja BPJ u individualne životinje predstavlja potvrđeni slučaj bolesti na razini stada.

Podatci su grupirani i obrađeni tako da su stada pretražena iz razloga kliničke sumnje BPJ obrađena zasebno od stada pretraženih iz drugih razloga.

Stado preživača je definirano kao skupina životinja prijemljivih vrsta smještenih na istom gospodarstvu uzorkovanih unutar 30 dana. Takva definicija proizašla je iz činjenice da je u određenom broju slučajeva u istom stadu i na istom gospodarstvu klinička sumnja prijavljivana više puta u različitim vremenskim razmacima, a samo u manjem broju takvih prijava sumnje je razmak između datuma prijave bio veći od 30 dana.

Stado individualne vrste preživača predstavlja skupinu životinja iste vrste, smještenih na istom gospodarstvu te uzorkovanih unutar 30 dana. Navedeno omogućava određivanje vrste domaćina BPJ u Hrvatskoj, kao i određivanje seroprevalencije i stvarne prevalencije unutar vrste.

Grupiranje podataka, definiranje kriterija za uključivanje i isključivanje podataka iz analize

Iz podataka JRDŽ-a o brojnom stanju goveda, ovaca i koza u razdoblju 01. siječnja 2014. - 31. prosinca 2014. godine korištene su varijable potrebne za analizu gustoće populacije preživača, broja stada i životinja po vrsti na razini županije, naselja i gospodarstva. Životinje i stada uključena u analizu nalazila su se na području Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske županije koje obuhvaćaju geografsko područje južnog hrvatskog primorja (regija Dalmacija). Iz analize podataka, ukoliko nije navedeno drugačije za posebne slučajeve analiza, isključena je Vukovarsko-srijemska županija smještena u geografskoj regiji Istočna Hrvatska (regija Slavonija) u kojoj je u studenom 2014. godine potvrđen jedan slučaj BPJ, u jednom stadu i na jednoj životinji jer isto nije značajno za analizu početka kliničke faze epizootije.

Tijekom kliničke faze epizootije model uzorkovanja činila su sva goveda, ovce i koze s kliničkim znakovima bolesti na gospodarstvu na području Republike Hrvatske, bez obzira na druge parametre kao što su primjerice tip proizvodnje, spol, dob ili pasmina.

Kako bi se odredio broj gospodarstava i stada preživača uzorkovanih radi sumnje, podatci o svim uzorkovanim životinjama bez obzira na vrstu podrijetlom s istog gospodarstva agregirani

su na jedan zajednički JIBG. Izvršena je provjera administrativnih podataka za svaki uzorak te su iz analize isključeni oni za koje se nije moglo dokazati podrijetlo (gospodarstva bez JIBG-a ili podataka o vlasniku), uzorci od životinja koje su više puta pretražene unutar razdoblja 30 dana na istom gospodarstvu bez jasnih kriterija, kao i dio duplih podataka nastalih greškom pri unosu u inicijalni set podataka u Excel tablicu. Podatci za obje godine grupirani su na istovjetan način te je na temelju datuma zaprimanja uzorka u laboratorij kreirana varijabla koja označava datum kliničke sumnje te datume početka i završetka kliničke faze epizootije. Kod određenog broja pretraživanja uočeno je da je vremensko razdoblje proteklo od datuma prijema uzorka u laboratorij do završetka pretrage iznimno dugo, čak i do 62 dana. Nadalje, uočeno je i da su, vjerojatno radi pojave kliničkih znakova u druge vrste preživača, različite vrste životinja iz istog gospodarstva uzorkovane u različite dane. Kako bi se podatci mogli obraditi ujednačeno te svrstati unutar određenih vremenskih intervala potrebnih za određivanje mjera učestalosti, prvi datum uzorkovanja unutar 30 dana određen je kao početak epizootije na gospodarstvu, a prvi datum testiranja individualne životinje predstavlja ujedno i datum testiranja stada. Klinička sumnja individualne životinje predstavlja kliničku sumnju stada te stoga datum prijavljene sumnje BPJ u individualne životinje predstavlja datum prijavljene sumnje BPJ u stadu.

Protokol testiranja uključivao je pretraživanje životinja sumnjivih na BPJ prvo imunoenzimnim testom, a sve serološki pozitivne životinje i molekularno metodom RT-PCR. Radi utvrđivanja serotipa virusa u tom vremenu dodatno se virus neutralizacijskim testom određivao serotip virusa u serumima serološki pozitivnih životinja. Uočeno je da se navedeni protokol testiranja nije uvijek poštivao što je bilo posljedica prekapacitiranosti laboratorija tijekom epizootije, stoga je određeni broj životinja podrijetlom iz naselja u kojima je BPJ već bila ranije potvrđena pretraživan samo metodom RT-PCR.

Od ukupno 2 512 uzoraka krvi pretraženih metodom ELISA iz analize su isključena 592 uzoraka podrijetlom s područja županija koje nisu interes istraživanja ove faze epizootije, te za

daljnju obradu izdvojeni podatci za 1 828 uzoraka s područja Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske županije.

Od ukupno 546 uzoraka krvi pretraženih metodom RT-PCR iz analize je isključen jedan uzorak podrijetlom s područja koje nije interes istraživanja ove faze epizootije, dok je 545 uzoraka krvi uvršteno u daljnju analizu. Analiza je provedena na svih 381 uzoraka pretraženih virus neutralizacijskim testom.

Uzorci odabrani za analizu varijance potječu od životinja u kojih je prijavljena klinička sumnja na BPJ te se odnose se na rezultate laboratorijskog pretraživanja imunoenzimnim testom. Za analizu varijance te određivanje hijerarhijski najviše razine isključena su stada s pretraženom samo jednom životinjom po gospodarstvu te naselja u kojima su pretražene manje od tri životinje. Radi ustanovljavanja relativne proporcije varijance na dvije hijerarhijske razine obrađeni su podatci laboratorijskog pretraživanja uzoraka od 1 133 ovce iz 82 stada te s područja 46 naselja.

Podatci o kliničkim znakovima bolesti dobiveni su analizom podataka iz epidemioloških upitnika i obrazaca prijave sumnji. Od ukupno 733 epidemioloških upitnika za analizu je prihvaćeno 645 upitnika prikupljenih s područja od interesa istraživanja. Iz te skupine potom je izdvojeno 44 epidemioloških upitnika u kojima su zabilježeni podatci o kliničkoj pojavi bolesti životinja. Dodatnom provjerom podataka isključeni su nevažeći upitnici (koji nisu sadržavali podatke o kliničkim znakovima bolesti i gospodarstvu).

Numeričke vrijednosti iz tablica kontingencije vjetra za glavne mjerne postaje Lastovo i Dubrovnik DHMZ-a za razdoblje 2009. do 2014. godine obrađene su na način da su relativne čestine i srednja brzina za pojedini smjer vjetra prikazane ružom vjetrova. Za glavne mjerne postaje Dubrovnik, Split, Šibenik i Zadar obrađene su numeričke vrijednosti temperature, vlage, brzine vjetra i oborina u razdoblju 01. lipanj 2014. do 01. srpanj 2015. godine.

Originalne dnevne vrijednosti za prosječnu, minimalnu i maksimalnu dnevnu temperaturu, prosječnu vlagu i brzinu vjetra te ukupnu količinu oborina na razini svake od četiriju županija južnog hrvatskog primorja dalje su obrađene kako bi se dobile vrijednosti na tjednoj razini za svaku županiju zasebno. Nadalje, stupanj-dan je bio izračunat po formuli koja je bila dostupna u Damos i sur. (2012.) kao način da se u izračun uključe maksimalne i minimalne dnevne temperature. Sve navedene dnevne vrijednosti bile su dalje obrađene na način da se izračunao tjedni prosjek dnevnih vrijednosti, gdje je početak i kraj tjedna bio proglašen na isti način kao i kod praćenja tjednih vrijednosti broja slučajeva. Dodatno, pored prosječnih vrijednosti, izračunat je ukupni zbroj kumulativnih količina oborina te ukupni tjedni zbroj stupanj-dana u svakom tjednu. Za svaku županiju izračunat je kumulativni broj novih slučajeva tijekom četiri tjedna prije tjedna od interesa. Prethodni izračun kumulativnog broja slučajeva u županiji zasnovan je na pretpostavci da će stada pozitivna na BPJ biti infektivna još četiri tjedna nakon prve potvrde virusa.

Nakon što su dobivene tjedne vrijednosti (prosjeci ili sume), kvantitativne varijable su opisane metodama deskriptivne statistike, što uključuje aritmetički prosjek i standardnu devijaciju, minimum i maksimum, 25% i 75% percentil te 50% percentil (medijan). Na bazi vrijednosti percentila, svaka od kvantitativnih varijabli je podijeljena u četiri kategorije (bazična vrijednost ili prvi kvantil 0-25% percentil), drugi kvantil (25-50% percentil), treći kvantil (50-75%) te četvrti kvantil (75-100% vrijednosti svake varijable). Tako izračunate vrijednosti su potom korištene u regresijskoj analizi u svrhu utvrđivanja čimbenika rizika za nove slučajeve BPJ u županiji tijekom kliničke faze epizootije.

4.4.2. Faza aktivne kontrole epizootije (od 15. srpnja 2015. do 31. prosinca 2019. godine)

Faza aktivne kontrole epizootije obuhvatila je analizu podataka o mjerama provedenim u okviru programa nadziranja BPJ tijekom razdoblja od 15. srpnja 2015. do 31. prosinca 2019. godine.

Za potrebe istraživanja ove faze *sumnja* BPJ definirana je kao pojava bilo kojeg kliničkog znaka koji ukazuje na BPJ u prijemljive vrste životinja ili pozitivan rezultat serološkog pretraživanja uzorka krvi imunoenzimnim testom ELISA bez prethodno utvrđenih kliničkih znakova bolesti ili postojanje epizootioloških podataka temeljem kojih se može postaviti sumnja na bolest (npr. kontaktna gospodarstva, premještanja životinja, korištenje zajedničkih pašnjaka).

Potvrđeni slučaj BPJ definiran je kao pozitivan rezultat molekularnog pretraživanja uzorka krvi lančanom reakcijom polimeraze uz prethodnu reverznu transkripciju.

Stado preživača je skupina životinja prijemljivih vrsta preživača smještenih na istom gospodarstvu uzorkovana tijekom propisanog razdoblja provedbe programa nadziranja.

Stado individualne vrste preživača predstavlja skupinu životinja iste vrste, smještenih na istom gospodarstvu te uzorkovanih u okviru programa nadziranja.

Grupiranje podataka, definiranje kriterija za uključivanje i isključivanje podataka iz analize

Iz podataka JRDŽ-a o brojnom stanju preživača korištene su varijable potrebne za analizu gustoće populacije preživača, broja stada i životinja po vrsti na razini županije, naselja i gospodarstva za svaku godinu zasebno. Podatci korišteni za analizu uključili su populaciju preživača s područja cijele RH.

Aktivno nadziranje BPJ temeljeno na laboratorijskom pretraživanju provodilo se u okvirima godišnjeg programa kojim je bilo obuhvaćeno serološko i molekularno praćenje unaprijed određenih sentinel životinja. Program se provodio u zadanim vremenskim razmacima tijekom godine, za koja se smatralo da postoji najveća vjerojatnost otkrivanja infekcije ili serokonverzije. Sentinel životinje u kontinentalnom području pretraživane su dva puta tijekom provedbe programa, a u obalnom području jednom mjesečno tako da razmak između dva uzorkovanja nije smio biti manji od 25 i veći od 30 dana (Tablica 3.).

Tablica 3. Vremensko razdoblje provedbe aktivnog nadziranja od 2015. do 2019. godine

Godina	Područje RH	Kontinentalni dio zemlje		Obalno područje
	Razdoblje provedbe aktivnog nadziranja	Prvo uzorkovanje	Drugo uzorkovanje	Mjesečno uzorkovanje
2015.	01.08. - 30. 12.	01.08. - 15.09.	15.11. - 31.12.	01.08. - 30. 12.
2016.	21.09. - 30. 12.	21.09. – 15.10.	15.11. - 31.12.	21.09. - 30. 12.
2017.	07.09. - 31.12.	07.09. - 15. 10.	15.11. - 31.12.	07.09. - 31.12.
2018.	23.10. - 31.12.	23.10. - 03.11.	01.12. - 31.12.	23.10. - 31.12.
2019.	01.08. - 31.12.	01.08. - 30.09.	01.11. - 13.12.	01.08. - 31.12.

Sentinel životinje morale su odgovarati sljedećim kriterijima:

- 2015. godine - goveda rođena u RH koja su na dan 15. travnja 2015. godine bila stara tri mjeseca i više te nisu bila cijepljena protiv BPJ
- 2016. godine – goveda rođena u RH koja su na dan 15. travnja 2015. godine bila stara tri mjeseca i više te nisu bila cijepljena protiv BPJ tijekom 2015. i/ili 2016. godine.
- 2017. - 2019. godine - goveda rođena u RH starosti najmanje 8 mjeseci, koja nisu cijepljena protiv BPJ, te za koje se pouzdano znalo da tijekom prethodne godine provođenja programa nadziranja nisu su bila serološki pretražena na BPJ s pozitivnim rezultatom. Ako za uzorkovanje nisu bila dostupna goveda navedene kategorije, kao zamjenske životinje uzrokovati su se mogle i ovce te koze rođene u RH, starosti najmanje 9 mjeseci te necijepljene protiv BPJ.

Kako bi se podatci mogli obraditi ujednačeno te svrstati unutar određenih vremenskih intervala potrebnih za određivanje mjera učestalosti, određeno je da datum testiranja individualne životinje predstavlja datum testiranja stada. Sumnja individualne životinje predstavlja sumnju stada te stoga datum prijavljene sumnje BPJ u individualne životinje predstavlja datum

prijavljene sumnje BPJ u stadu. Varijabla koja označava pozitivno stado načinjena je kombinacijom vrste životinje i testa, a rezultat barem jednog potvrđenog slučaja BPJ u individualne životinje predstavlja potvrđeni slučaj bolesti na razini stada.

Kako bi se odredio broj gospodarstava i stada preživača uzorkovanih u svrhu provedbe programa, podatci o svim uzorkovanim životinjama bez obzira na vrstu podrijetlom s istog gospodarstva agregirani su na jedan zajednički JIBIG. Provjerom administrativnih podataka nisu utvrđeni nedostaci zbog kojih bi se uzorci morali isključiti iz daljnjih analiza te je svih 16 452 uzoraka pretraženih imunoenzimnim testom uvršteno u obradu podataka. Podatci za svaku godinu pretraživanja grupirani su na istovjetan način te je na temelju datuma zaprimanja uzorka u laboratorij kreirana varijabla koja označava datum sumnje/potvrđenog slučaja te datumi početka i završetka faze aktivne kontrole epizootije.

Protokol testiranja uključivao je prvo serološko pretraživanje uzoraka imunoenzimnim testom. Svaki serološki pozitivan uzorak (njih ukupno 5869) pretraženo je potom metodom RT-PCR za otkrivanje serotipova 1-27. Jednom serološki pozitivna sentinel životinja bez obzira na ishod molekularnog pretraživanja isključena je iz daljnjeg pretraživanja.

Deskriptivna statistika načinjena je na rezultatima laboratorijskih pretraživanja sentinel životinja. Uključeni su svi rezultati pretraživanja imunoenzimnim testom i metodom RT-PCR dostupni za razdoblje aktivne faze epizootije. Za određivanje mjera učestalosti obrađeni su podatci laboratorijskog pretraživanja uzoraka od 16 452 životinja iz 792 stada, s područja 84 naselja i 21 županije. Podatci provedenih entomoloških istraživanja komarčića roda *Culicoides* u razdoblju od 2015. do 2019. godine analizirani su kako bi se utvrdila prisutnosti i dinamika pojavljivanja komarčića roda *Culicoides* te njihove zemljopisne rasprostranjenosti, utvrdila područja i razdoblja godine od najvećeg rizika za pojavu i širenje virusa te odredilo razdoblja sezonski slobodnog od vektora virusa BPJ, odnosno razdoblja kada nisu aktivni adulti roda

Culicoides. Obrađeni podatci prikupljeni su s unaprijed određenih lokacija koje su uključivale po jedno naselje iz svake županije te je izvršena analiza na 427 353 izdvojenih komarčića.

Analiza mjere preventivnog cijepljenja goveda, ovaca i koza provedena je na razini godine, županije, naselja, stada i vrste životinje te su istom obuhvaćena 4 946 342 preventivnih cijepljenja provedenih tijekom pet godina na području cijele RH i rezultati kontrole imuniteta provedene na 53 stada.

4.5. Obrada podataka

Podatci o laboratorijskim pretraživanjima, klimatskim čimbenicima i cijepljenju životinja ekstrahirani su u Microsoft Excel tablicu te konvertirani u csv. datoteku i obrađeni korištenjem programa R verzija 4.1.0 te Stata SE 15,1 softvera.

Podatci o brojnom stanju životinja, kliničkim znakovima i entomološkom nadziranju ekstrahirani su u MS Excel tablicu te obrađeni pomoću alata navedenog programa.

Za izradu kartografskih prikaza korišten je software ArcGIS Pro 2.9. proizveden od strane tvrtke ESRI, a korišteni su prostorni podaci iz središnjeg registra prostornih jedinica koji su povezani sa podacima o brojnom stanju životinja te rezultatima seroprevalencije i prevalencije pripremljenim u programskom paketu MS Excel.

4.5.1. Razdoblje kliničke faze epizootije

Razdoblje kliničke faze epizootije i rana faza unosa BPJ analizirani su putem ustanovljavanja mjera učestalosti bolesti uključujući incidenciju i prevalenciju na razini stada i na razini individualne životinje. Podatci su bili analizirani na razini gospodarstva koje je držalo bilo koju vrstu preživača, te se dodatna analiza provodila i za stada individualnih vrsta preživača. Radi prikaza tjedne incidencije na istovjetan način, sva izbijanja BPJ na razini jednog tjedna sumirana su na prvi datum u tjednu.

Deskriptivna statistika je uključivala tablice frekvencija te epidemiološke krivulje.

Hijerarhijska logistička regresija s binarnim ishodom (pozitivno/negativno) serološkog testiranja imunoenzimnim testom kod ovaca korištena je kako bi se ustanovila relativna varijabilnost u serološkoj pozitivnosti na razini županije, naselja i stada; gdje su se potonje administrativne jedinice koristile kao stohastički efekti u hijerarhijskoj logističkoj regresiji (DOHOO i sur., 2001., 2010.). Različite kombinacije tri proučavane administrativne cjeline (stado, naselje i županija) korištene su kako bi se ustanovila robusnost rezultata. Samo stada koja su imala barem dva serološka testa (najmanje dvije životinje) su uključena u potonju analizu. Analiza je provedena u Stata SE softvera koristeći zadane parametre.

Faktori rizika za broj slučajeva BPJ u županiji tijekom kliničke faze epizootije ustanovljeni su putem negativne binomijalne regresije sa stohastičkim efektom županije na interceptu. Ishod je bio definiran kao broj stada preživača koji su utvrđeni kao novi slučajevi BPJ po prvi puta u specifičnom tjednu u svakoj od četiri županije. Faktori rizika su predstavljani kao različite klimatske i druge varijable na razini županije i specifičnog tjedna. Statistička analiza je uključivala evaluaciju korelacije između kvantitativnih varijabli, te evaluaciju linearnog odnosa između broja slučajeva i svake kvantitativne varijable putem LOESS neparametrijske regresije koja kombinira jednostavnost i pragmatičnost linearne regresije s fleksibilnošću nelinearne regresije. Uočeno je da neke od varijabli imaju nelinearni odnos s ishodom analize, te je odlučeno da se svaka kvantitativna varijabla statistički vrednuje i kao linearni efekt kvantitativne varijable i kao kategorijska varijabla s četiri razine, bazirana na kvantilima u kojoj prvi kvantil služi kao polazna razina s kojom su se sve druge razine uspoređivale. Nakon toga, asocijacija između svake varijable i broja slučajeva ustanovljena je primjenom univarijabilnog regresijskog modela s uključenom samo jednom varijablom. Multivarijabilni regresijski modeli bili su konstruirani od varijabli koje su bile statistički značajne tek nakon što su zajednički bile uključene u modele. U slučaju da je više različitih multivarijabilnih modela sadržavalo

statistički značajne varijable, konačni model bio je određen kao multivarijabilni model s najnižom vrijednosti Akaikeovog informacijskog kriterija (AIC).

4.5.2. Razdoblje faze aktivne kontrole epizootije

Faktori rizika za otkrivanje pozitivne sentinel životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije su bili ustanovljeni putem logističke regresije sa stohastičkim efektom županije na interceptu, te fiksnog efekta godine. Ishodi analize su bili pozitivni i negativni rezultati imunoenzimnog testa na razini individualne životinje. Dodatne varijable koje su bile uključene u analizu kao varijable od primarnog interesa su bile postotak cijepljenih goveda, ovaca, koza te ukupno preživača u svakoj godini i na razini svake županije. Postoci cijepljenja su bili izračunati kao postotak cijepljenih životinja, i kao postotak cijepljenih stada u svakoj županiji za svaku godinu. Pored toga, broj stada individualne vrste preživača te broj životinja individualne vrste preživača su bili korišteni kao varijable od dodatnog interesa. Svaka od tih dodatnih varijabli je bila pojedinačno vrednovana za statističku značajnost u logističkom modelu koji je uključivao godinu kao fiksni efekt i županiju kao stohastički efekt. Univarijabilna analiza je provedena na način da su sve varijable bile vrednovane kao kvantitativne varijable putem kojih se procijenila linearna asocijacija te kao kategorijske varijable putem uključivanja četiri kategorije kvantila. Liberalna p-vrijednost od 0,20 se koristila kao vrijednost uključivanja u multivarijabilni model. Multivarijabilni logistički regresijski modeli su bili konstruirani od varijabli koje su bile statistički značajne tek nakon što su zajednički bile uključene u modele. Stoga je multivarijabilni model asocijacije između broja novih slučajeva i faktora rizika izrađen gradnjom modela u kojem su se varijable ugrađivale u model postupno i manualno. U slučaju visoke korelacije, uključena je bila samo varijabla koja je imala najveći biološki smisao, odnosno u slučaju da je više različitih multivarijabilnih modela sadržavalo statistički značajne varijable, konačni model bio određen kao multivarijabilni model s najnižom vrijednosti Akaikeovog informacijskog kriterija (AIC). Koeficijenti logističke regresije izraženi su na

originalnoj logit skali, te dodatno kao omjer izgleda. Sama regresijska analiza je bila provedena na temelju preporuka iz Dohoo i sur. (2010.). Entomološki podatci analizirani su deskriptivno.

5. REZULTATI

5.1. Brojno stanje životinja, analiza distribucije stada i životinja

5.1.1. Analiza brojnog stanja i distribucije stada i životinja tijekom kliničke faze epizootije (2014. godina)

Podatci o ukupnom broju stada i preživača prema vrsti životinje razdijeljeni na regiju Dalmacija te ostatak RH koji obuhvaća preostalih 17 županija smještenih u regiji sjevernog hrvatskog primorja te središnje, istočne i gorske Hrvatske navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Podatci o brojnom stanju preživača u RH u 2014. godini

Županija	Ukupno stada	Ukupan broj preživača	Ukupan broj goveda	Ukupan broj ovaca	Ukupan broj koza
Dalmacija	8627	253 761	17 644	202 322	33 785
ostatak RH	46 913	854 594	439 330	383 119	32 145
RH ukupno	55 540	1 108 355	456 974	585 441	65 930

Uočeno je da populacija preživača nije bila jednoliko distribuirana u svima naseljima unutar jedne županije (Tablica 5.).

Tablica 5. Broj stada i životinja na razini županije i naselja u regiji Dalmacija 2014. godine

Županija	Ukupno naselja	Ukupno stada preživača	GOVEDA		OVCE		KOZE	
			Broj stada	Broj životinja	Broj stada	Broj životinja	Broj stada	Broj životinja
Dubrovačko-neretvanska	137	489	231	1.775	134	4.284	124	1.330
Splitsko-dalmatinska	293	3094	1.509	6.779	942	43.835	643	12.166
Šibensko-kninska	178	2380	771	4.267	1.159	58.119	450	7.048
Zadarska	199	2664	431	4.823	1.842	96.094	391	13.241

Prosječna veličina stada preživača na području regije Dalmacije iznosila je 29,4 životinje.

Najmanje stado preživača u svim promatranim županijama brojilo je 1 životinju, dok je najveće stado na području Dubrovačko-neretvanske županije brojilo 588 životinja, Splitsko-dalmatinske županije 913 životinja, Šibensko-kninske županije 619 životinja i Zadarske županije 2688 životinja. U svim županijama dominirala su gospodarstva mješovitog tipa stada, s više od jedne vrste preživača. Više od 83% svih gospodarstava preživača držalo je manje od 50 životinja (83, 69%), od 51-100 životinja držalo je 10, 58% gospodarstava, od 101-500 životinja 5,55% gospodarstava, od 501-1000 životinja 0,14% gospodarstava i više od 1000 životinja držalo je 0,05% gospodarstava. Ukupan broj stada preživača u odnosu na veličinu te prosječan broj preživača po stadu, na razini županije prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Stada preživača prema veličini i prosječnom broju životinja na razini županije

Veličina stada preživača	Zadarska	Šibensko-kninska	Splitsko-dalmatinska	Dubrovačko-neretvanska
manje od 50	1989	1966	2804	458
51 - 100	451	283	162	16
101-500	217	129	120	13
501-1000	7	2	3	0
1000 i više	3	0	1	0
prosječan broj preživača po stadu	42,85	29,17	20,29	15,11

5.1.2. Analiza brojnog stanja životinja te distribucije stada i životinja tijekom faze aktivne kontrole epizootije (2015. - 2019. godine)

Ukupan broj gospodarstava preživača u RH te ukupan broj životinja držanih na tim gospodarstvima za razdoblje 2015. do 2019. godine prikazan je u Tablici 7.

Tablica 7. Ukupan broj gospodarstava preživača i broja životinja u RH tijekom razdoblja 2015. - 2019. godine

UKUPNO PREŽIVAČI RH		
Godina	Broj gospodarstava	Broj životinja
2015.	56 922	1 159 561
2016.	55 918	1 169 891
2017.	54 459	1 195 430
2018.	47 508	1 156 797
2019.	44 918	1 197 237

Tijekom razdoblja 2015. - 2019. godine u prosjeku je 52,73% gospodarstava držalo goveda, 37,04% ovce, a 10,24% koze. Od ukupnog broja preživača 55,41% su bile ovce, 37,97% goveda i 6,63% koze. Podatci o ukupnom broju gospodarstava i životinja individualne vrste preživača (govedo, ovca, koza) u RH za razdoblje 2015. do 2019. godine navedeni su u Tablici 8.

Tablica 8. Ukupan broj gospodarstava i životinja individualne vrste preživača u RH za 2015. - 2019. godinu

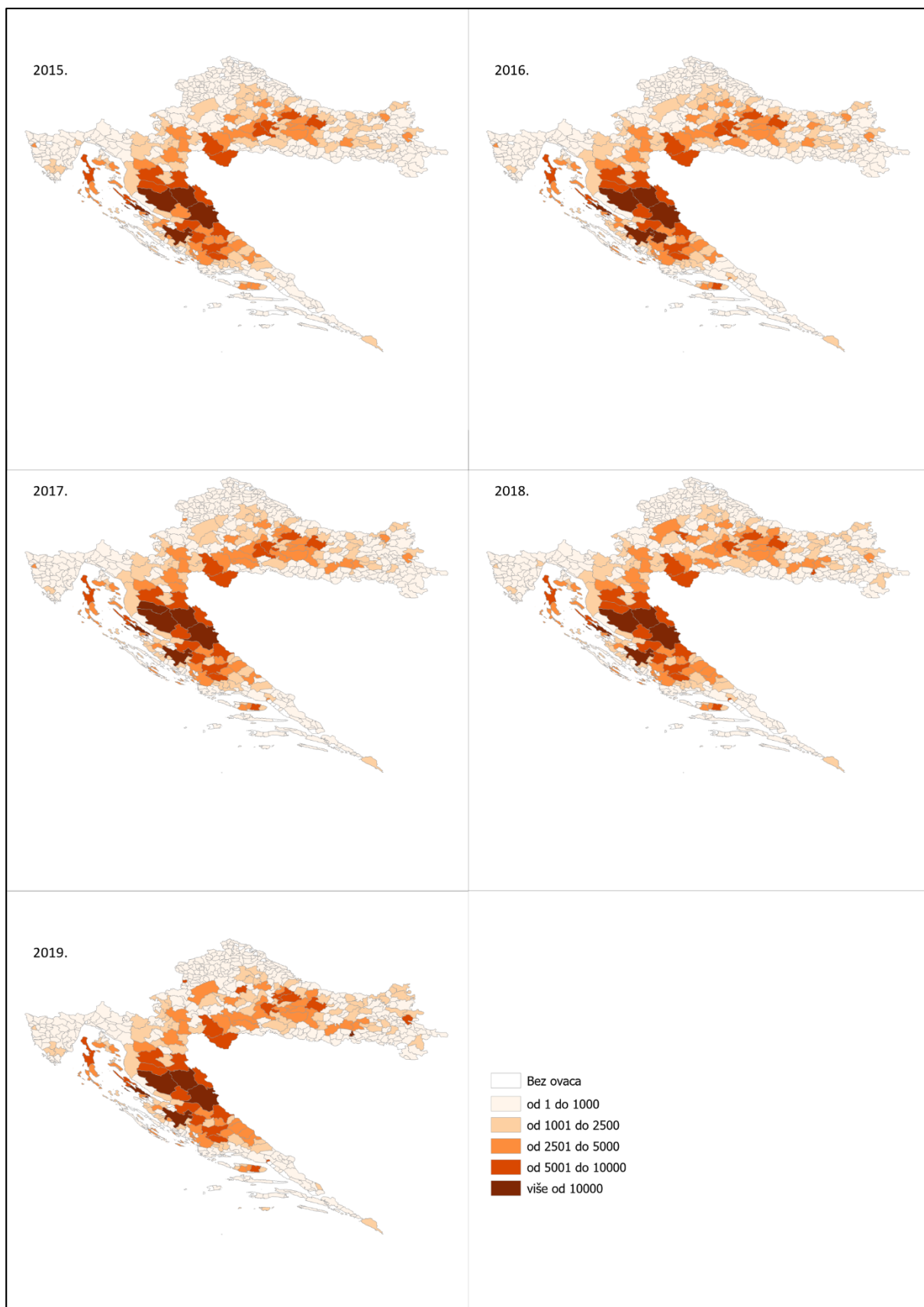
Godina	GOVEDA		OVCE		KOZE	
	Broj gospodarstava	Broj životinja	Broj gospodarstava	Broj životinja	Broj gospodarstava	Broj životinja
2015.	32 753	470 009	18 921	615 717	5248	73 835
2016.	31 244	462 277	19 249	632 087	5425	75 527
2017.	295 16	467 853	19 500	648 818	5443	78 759
2018.	23 220	412 876	19 067	664 037	5221	79 884
2019.	21 174	418 471	18 680	697 216	5064	81 550

Tijekom promatranog petogodišnjeg razdoblja najveći broj goveda držan je na području Osječko-baranjske županije (srednja vrijednost 83 542 životinja), a najmanji u Dubrovačko – neretvanskoj (srednja vrijednost 1713,2 životinja). Najviše ovaca držano je na području Zadarske županije (srednja vrijednost 107 909,8 životinja), a najmanje u Međimurskoj županiji

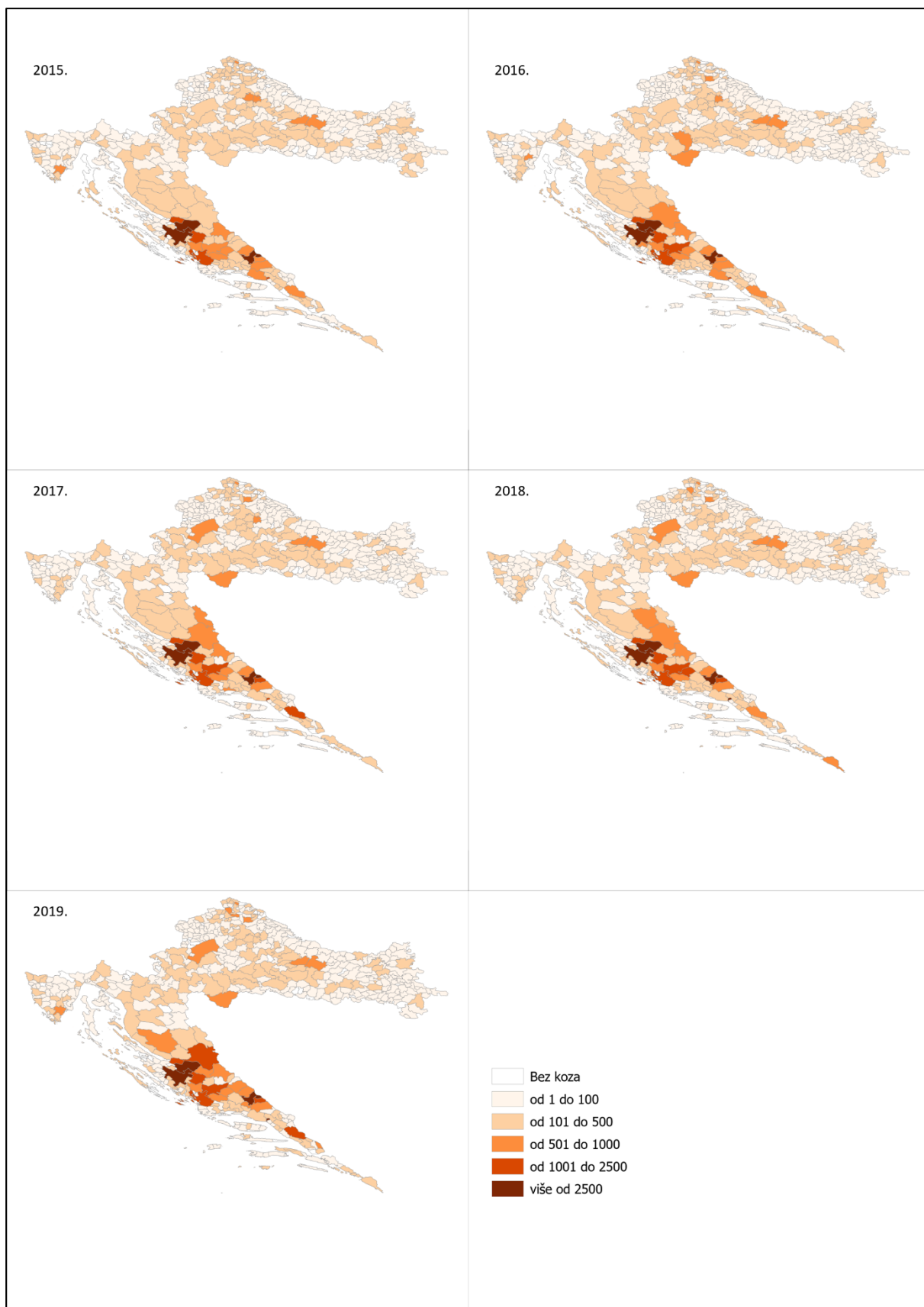
(srednja vrijednost 815,6 životinja). Broj držanih koza najveći je bio u Splitsko-dalmatinskoj županiji (srednja vrijednost 14 394,8 životinja), a najmanji u Gradu Zagrebu (srednja vrijednost 504 životinja). Gustoća naseljenosti životinja na razini vrste, naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine prikazana je na Slikama 23. do 25.



Slika 23. Prikaz gustoće naseljenosti goveda na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine

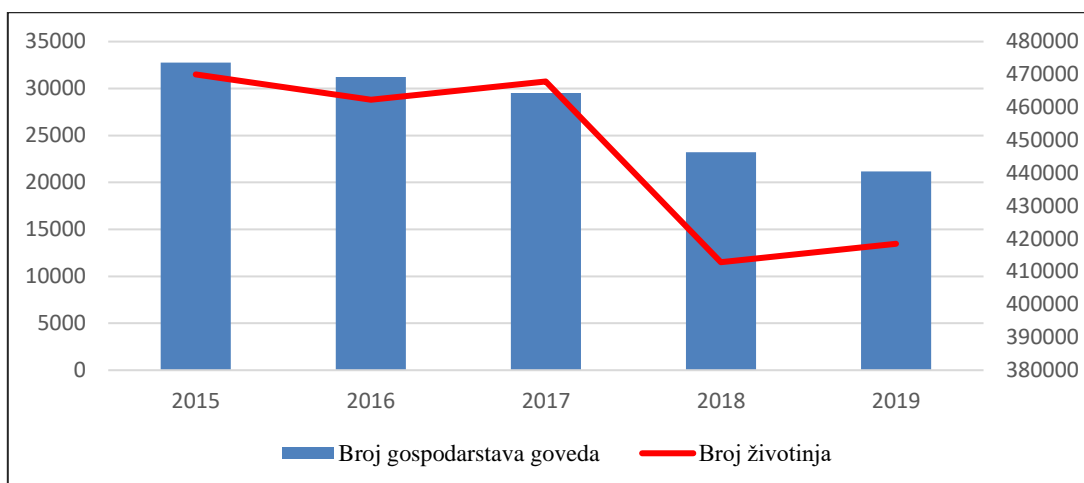


Slika 24. Prikaz gustoće naseljenosti ovaca na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine

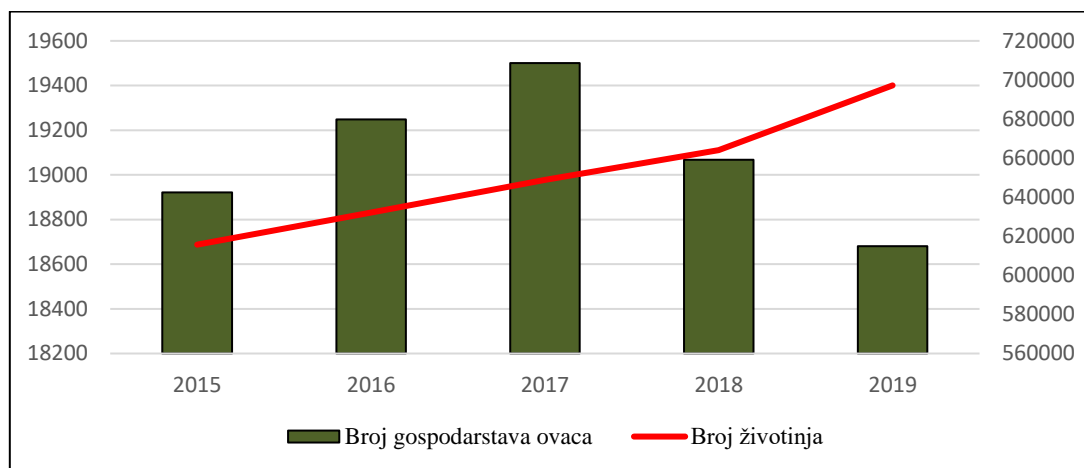


Slika 25. Prikaz gustoće naseljenosti koza na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine

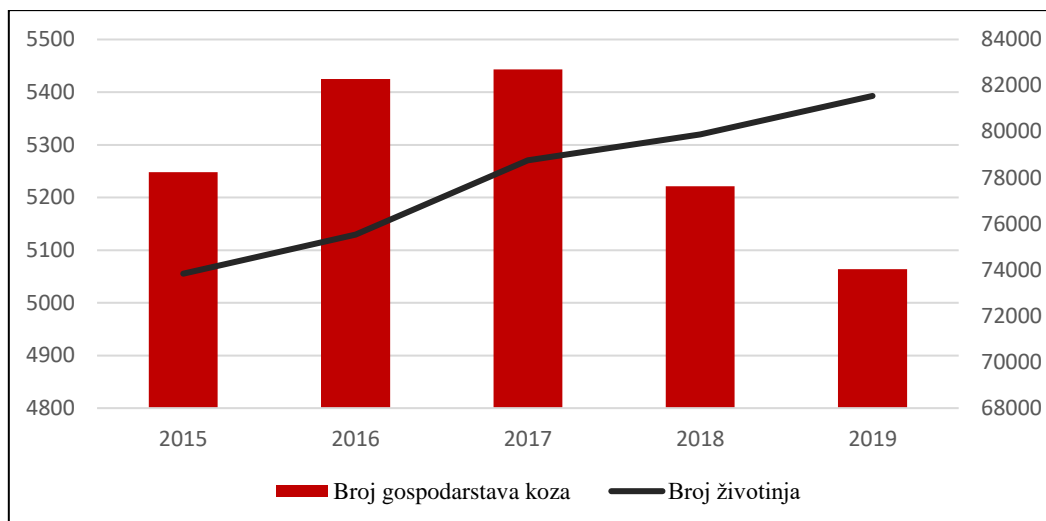
Kroz petogodišnje razdoblje prosječna veličina gospodarstva goveda brojila je 16,18 životinja, ovaca 34,14 životinja te koza 14,76 životinja. Dinamika kretanja broja gospodarstva preživača i broja životinja od 2015. do 2019. godine za svaku vrstu preživača zasebno prikazana je na Slikama 26. do 28., a gustoća gospodarstava na razini naselja na Slikama 29. do 31.



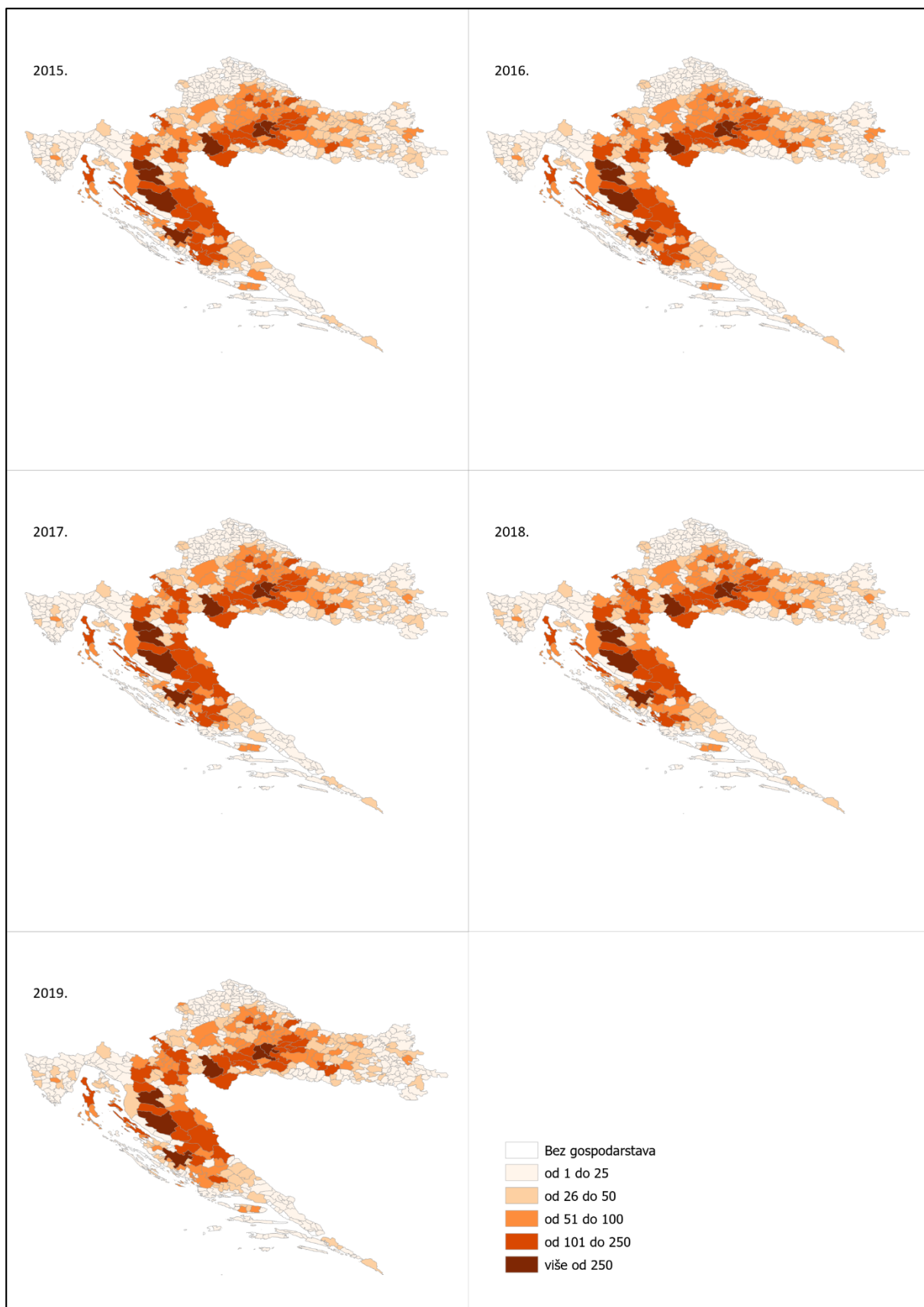
Slika 26. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstva goveda i broja goveda u RH 2015.-2019.



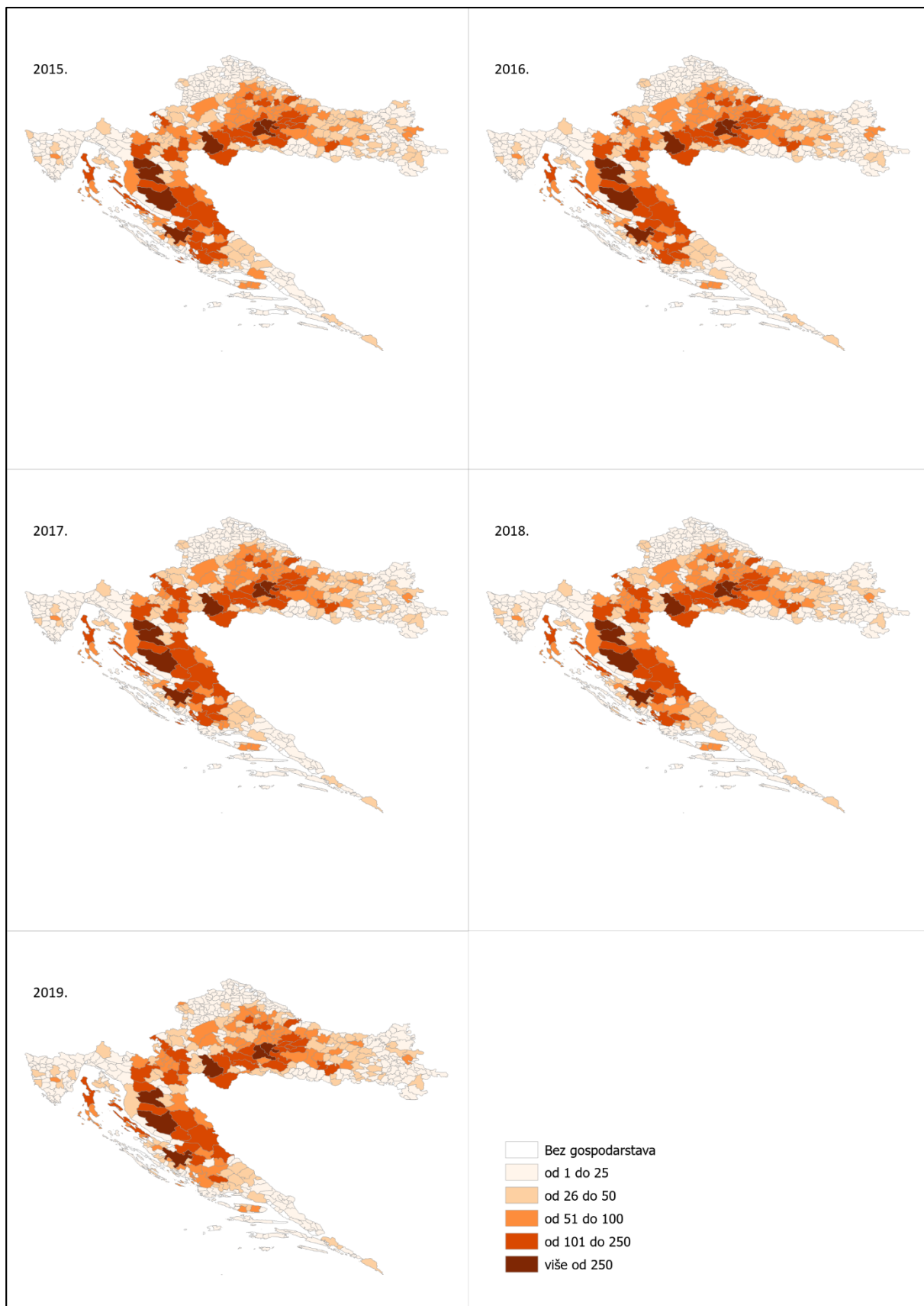
Slika 27. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstava ovaca i broja ovaca u RH 2015.-2019. godine



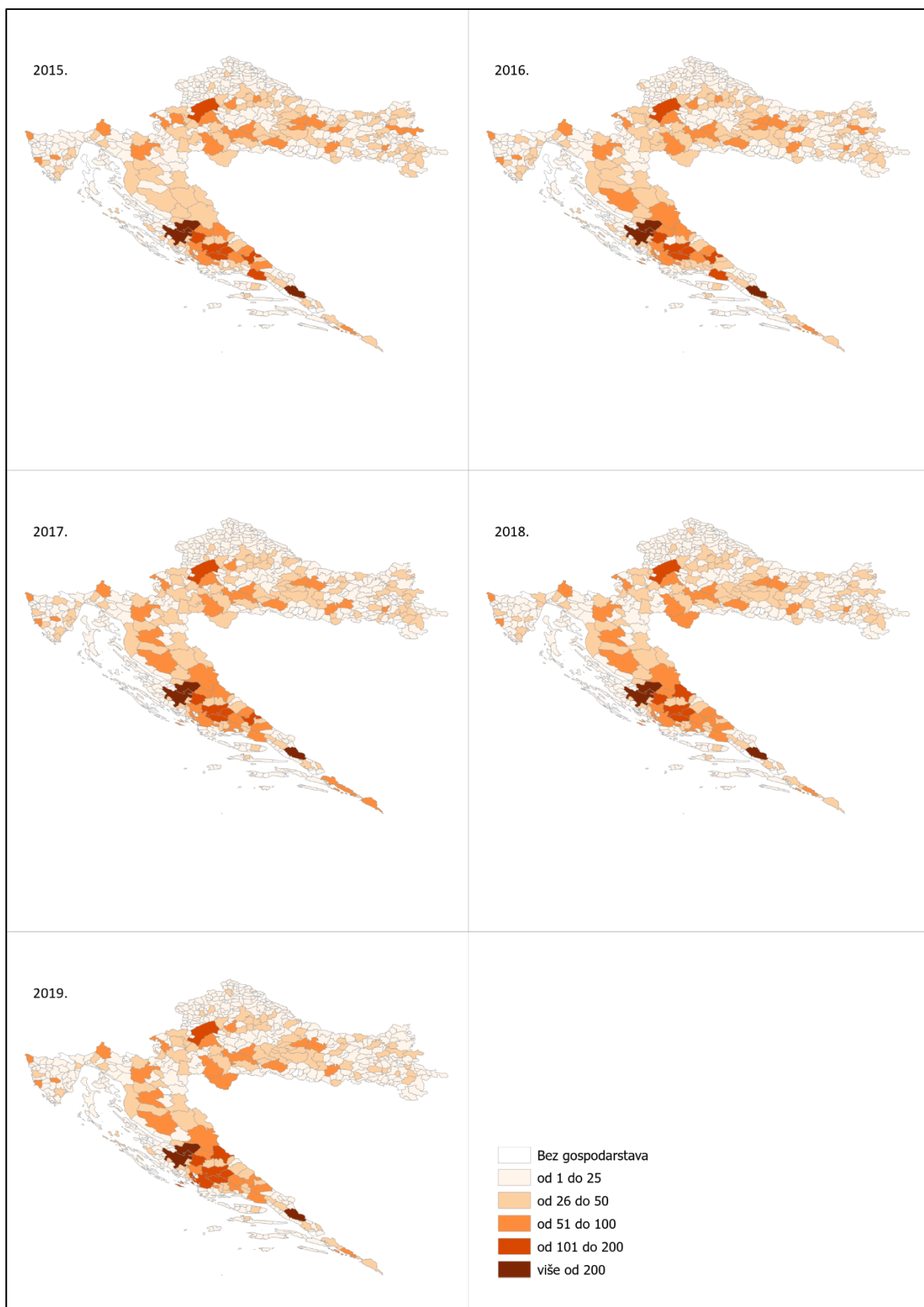
Slika 28. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstava koza i broja koza u RH 2015.-2019. godine



Slika 29. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže goveda u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine



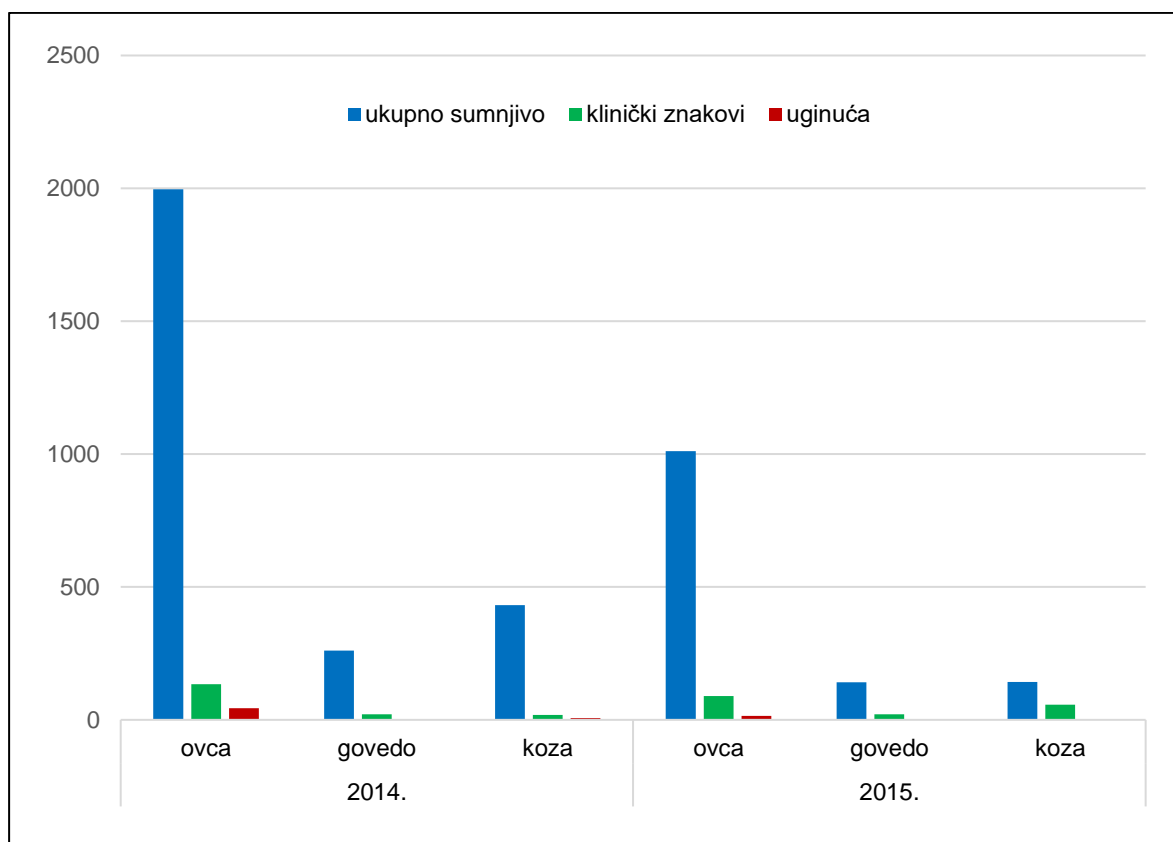
Slika 30. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže ovce u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine



Slika 31. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže koze u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine

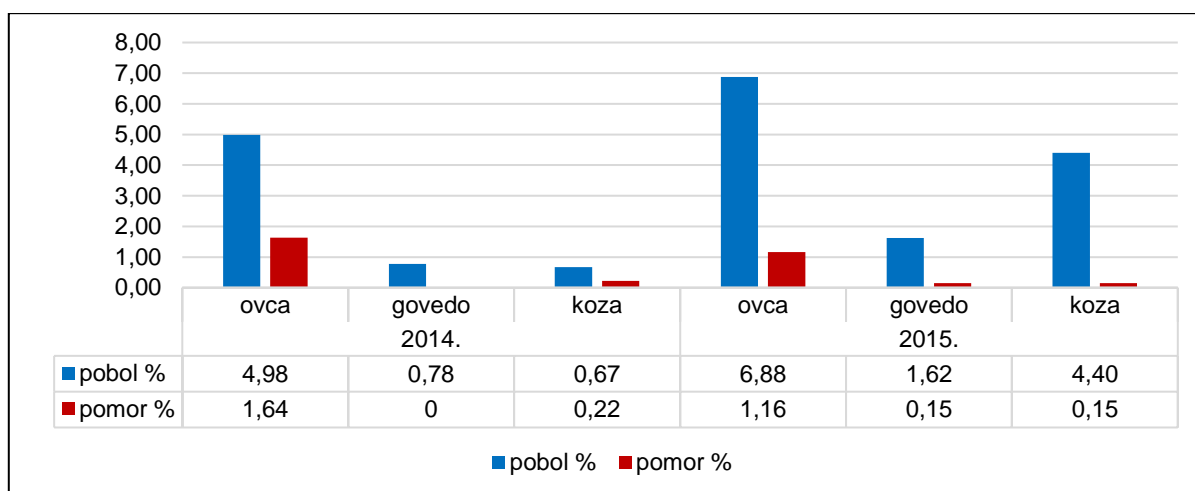
5.2. Analiza prijavljenih kliničkih znakova BPJ

Prva sumnja BPJ prijavljena je 26. listopada 2014. na gospodarstvu s više vrsta preživača u naselju Grude u Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Na gospodarstvu se nalazilo 20 goveda i 29 ovaca, a klinički znakovi BPJ (povišena tjelesna temperatura, opća slabost, iscjedak iz nosa, otok sluznice usta) utvrđeni su u četiri ovce (4/49). Nakon toga uslijedile su daljnje prijave sumnji na području Dubrovačko-neretvanske, te potom Šibensko-kninske, Zadarske i Splitsko-dalmatinske županije. Prikaz ukupnog broja životinja s utvrđenim kliničkim znakovima BPJ i broja uginulih životinja, u odnosu na ukupan broj sumnjivih životinja po vrsti tijekom 2014. i 2015. godine prikazan je na Slici 32. Svi podatci o kliničkim znakovima i uginućima životinja izdvojeni su iz epidemioloških upitnika. Uginuća uzrokovana BPJ nisu dokazana i objektivno odgovarajućim dijagnostičkim postupcima, već su temeljem potvrde cirkulacije virusa BPJ na gospodarstvu ista bilježena kao posljedica BPJ.



Slika 32. Broj životinja s utvrđenim kliničkim znakovima BPJ i broj uginulih u odnosu na ukupan broj sumnjivih životinja po vrsti tijekom 2014. i 2015. godine

Ukupan pobol preživača tijekom 2014. godine iznosio je 6,43%, a pomor 1,85%, dok je u 2015. godini utvrđen pobol od 12,9% te pomor od 1,46% (Slika 33.).



Slika 33. Grafički prikaz pobola i pomora izražen u postotku po vrsti preživača i godini

Prema podacima prikupljenim iz epidemioloških upitnika i obrazaca prijave sumnji ukupno su klinički znakovi BPJ zabilježeni kod 251 preživača. Klinički znakovi bolesti najučestalije su prijavljivani u ovaca (66,93%), zatim koza (18,73%) te potom goveda (14,34%). Najveći broj kliničkih znakova (61,9%) prijavljen je na području Dubrovačko-neretvanske županije i to u ovaca. Najučestaliji klinički znak u svih vrsta životinja (a kod goveda i jedini) bio je iscjedak iz nosa, dok su edem i cijanoza jezika kao karakteristični znakovi BPJ prijavljeni u svega šest životinja (Tablica 9.).

Tablica 9. Klinički znakovi u odnosu na učestalost pojave po vrsti životinje zabilježeni 2014. godine

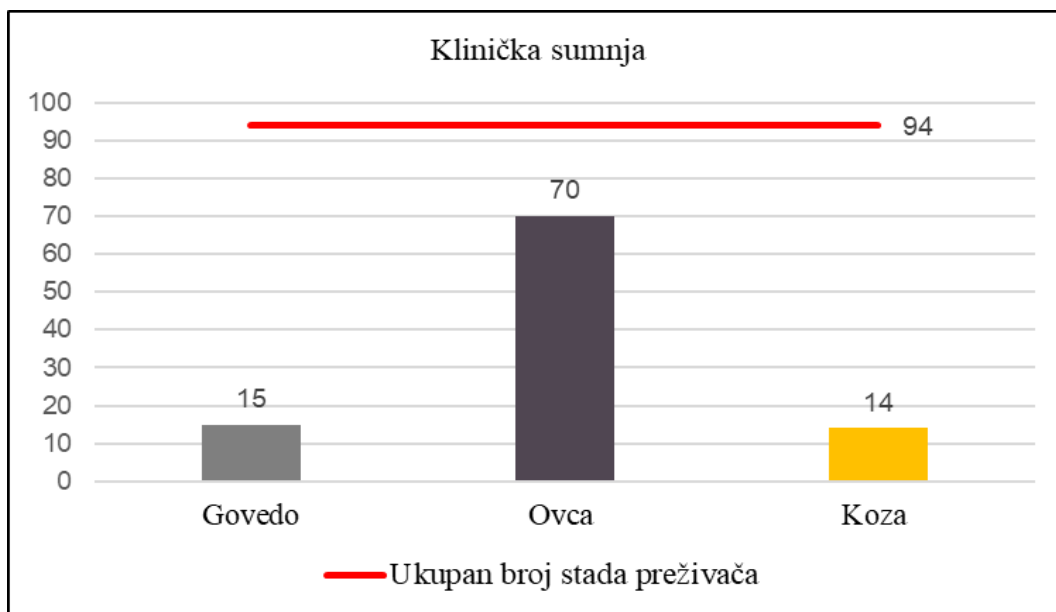
Klinički znak	Ovca	Koza	Govedo
iscjedak iz nosa	99	47	36
opća slabost	91	1	0
otok sluznice usta	73	0	0
povišena temperatura	72	0	0
edem glave i međuviličnog područja	49	2	0
šepanje	48	0	0
edem i cijanoza jezika	6	0	0
pobačaj	6	6	0
otok i crvenilo međupapčanog prostora	3	0	0
drugo	0	0	0

5.3. Deskriptivna statistika za razdoblje kliničke faze epizootije

5.3.1. Vremenska i prostorna distribucija mjera učestalosti (seroprevalencije, incidencije, kumulativne incidencije te stvarne prevalencije)

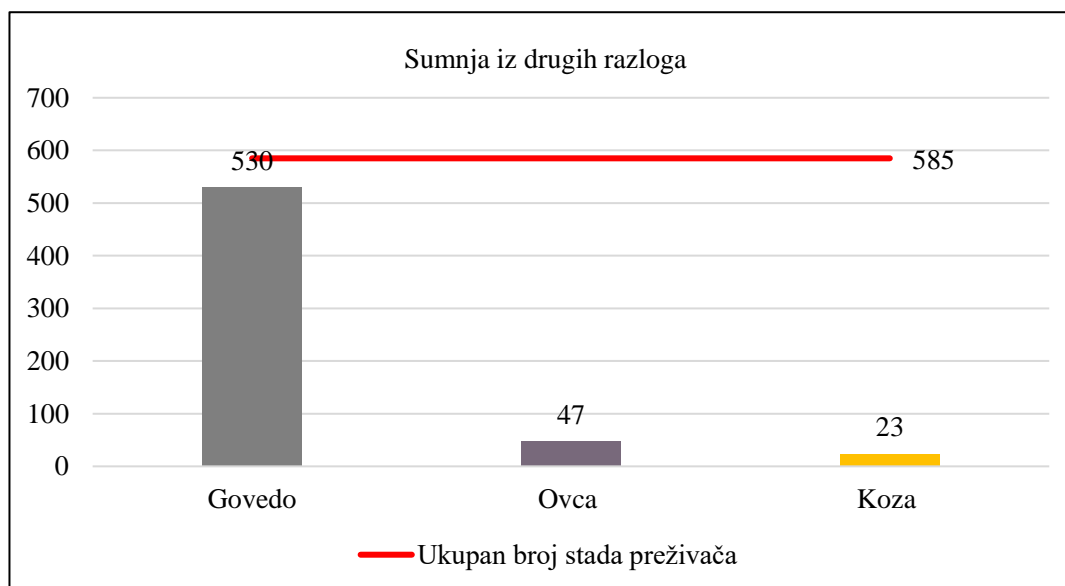
Tijekom kliničke faze epizootije uzorkovanja su provedena u 46 različitih naselja i to 35 naselja u Dubrovačko-neretvanskoj, 7 u Splitsko-dalmatinskoj, 3 u Zadarskoj i 1 naselju u Šibensko-kninskoj županiji.

Zbog postavljanja kliničke sumnje na BPJ tijekom 2014. i 2015. godine ukupno su pretražena 92 gospodarstva s 94 stada preživača, odnosno ukupno 99 stada individualne vrste preživača. Od toga su 63 gospodarstva (68,47%) pretražena samo jednom, a 29 gospodarstava (31,52%) dva ili više puta. Broj stada individualne vrste preživača po vrsti životinje pretraženih zbog kliničke sumnje prikazan je na Slici 34.



Slika 34. Grafički prikaz broja pretraženih stada individualne vrste preživača (po vrsti životinje) u odnosu na ukupan broj stada preživača pretraženih radi kliničke sumnje na BPJ

Zbog sumnje iz drugih razloga na BPJ ukupno je pretraženo 585 gospodarstava s 585 stada preživača te ukupno 600 stada individualne vrste preživača (Slika 35.).

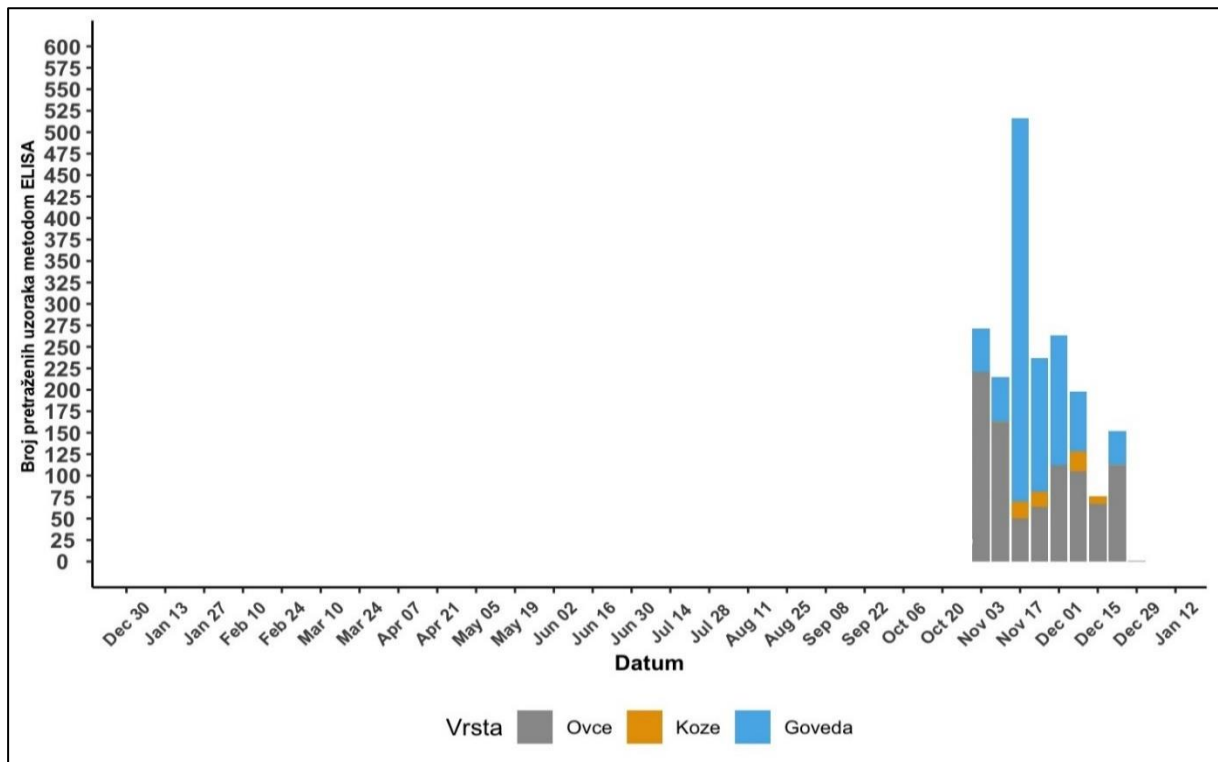


Slika 35. Grafički prikaz broja stada individualne vrste preživača pretraženih radi sumnje iz drugih razloga u odnosu na ukupan broj pretraženih stada preživača

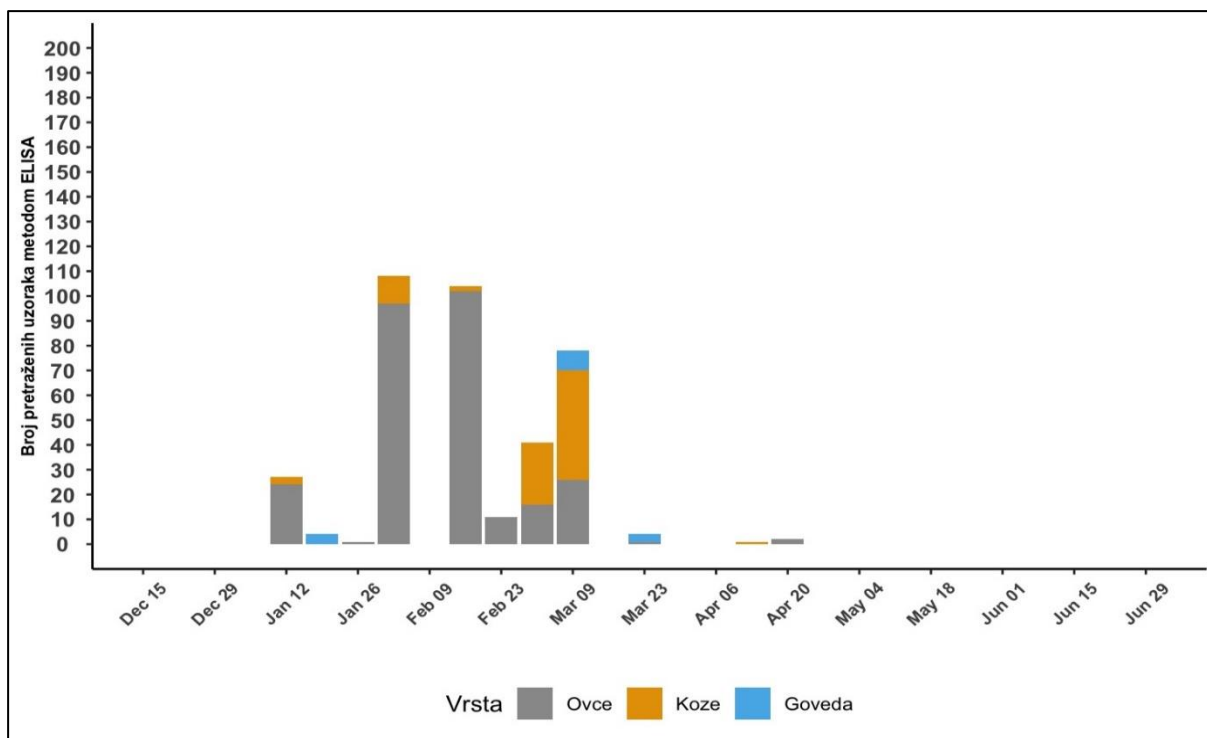
Najveći ukupan broj sumnji na BPJ (62,92%) prijavljen je u Dubrovačko – neretvanskoj županiji. Od toga se 83,92% odnosi se na kliničku sumnju, a 16,07% na sumnje prijavljene iz

drugih razloga.

Za datum početka kliničke faze epizootije određen je 27. listopada 2014. godine (datum zaprimanja prvih uzoraka kliničke sumnje BPJ u laboratorij), a kao završetak 01. srpanj 2015. godine. U navedenom razdoblju imunoenzimnim testom pretražena su ukupno 1 832 preživača od čega 708 radi kliničke sumnje, a 1 124 radi sumnje iz drugih razloga (Slika 36. i 37.).



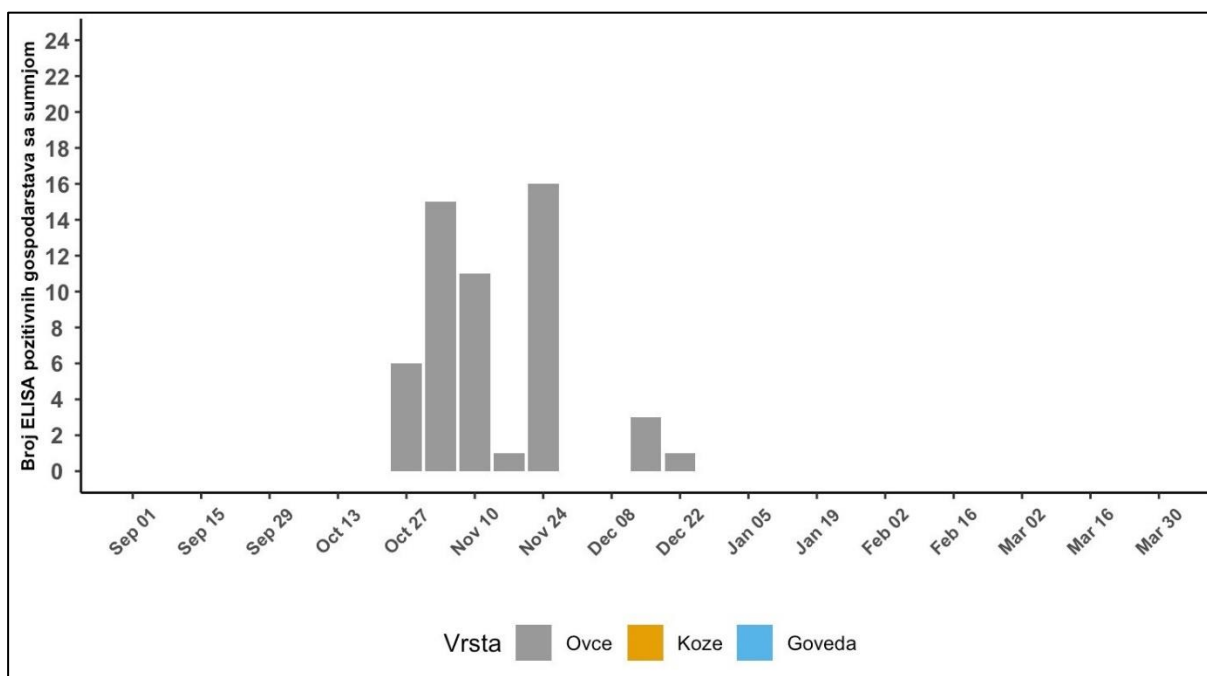
Slika 36. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka imunoenzimnim testom 2014. godine po vrsti uzorkovane životinje



Slika 37. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka imunoenzimnim testom 2015. godine po vrsti uzorkovane životinje

Radi kliničke sumnje imunoenzimnim testom pretraženo je ukupno 59 stada te 708 preživača.

Od toga su 53 stada i 208 preživača pretraženi s pozitivnim rezultatom (Slika 38.).

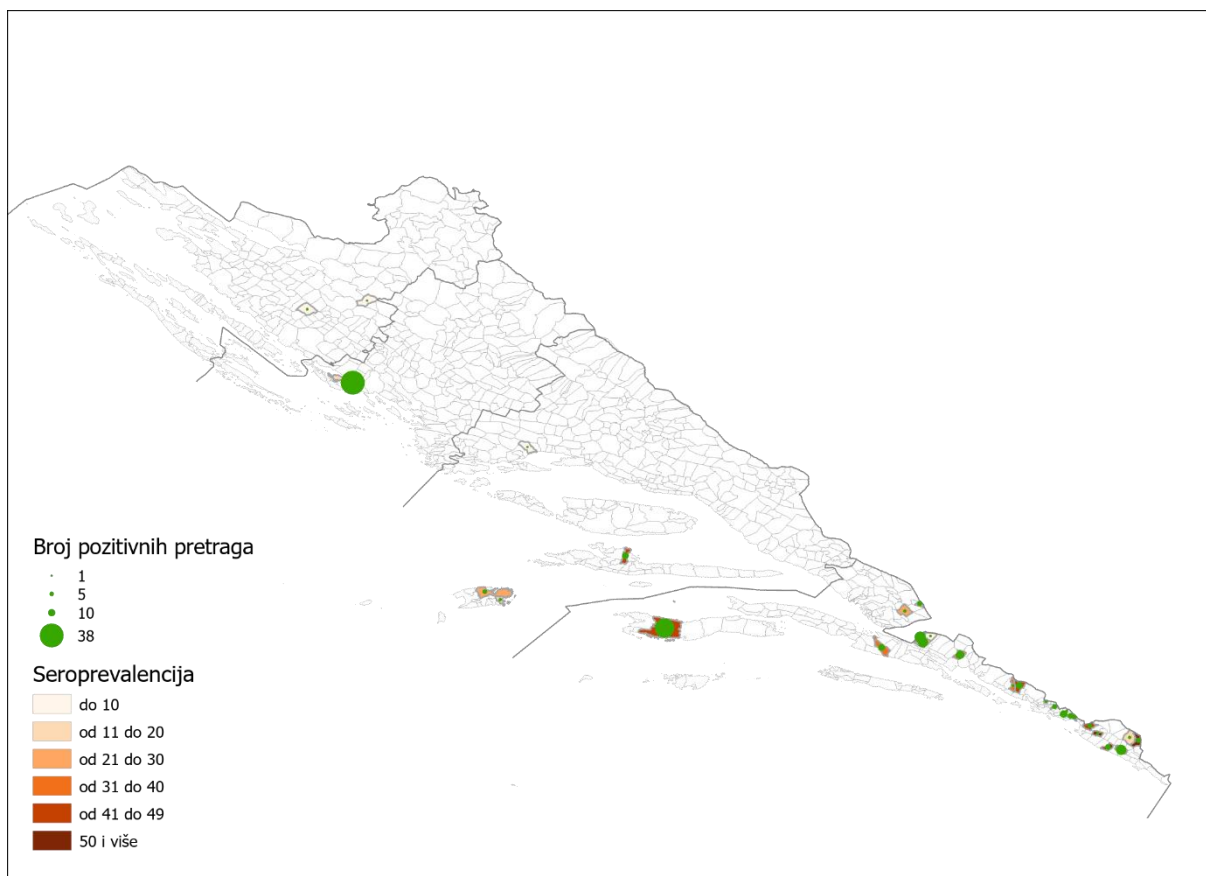


Slika 38. Grafički prikaz broja serološki pozitivnih gospodarstava/stada po vrsti preživača tijekom 2014. i 2015. godine uzorkovanih zbog postavljene kliničke sumnje

Seroprevalencija stada pretraženih zbog postavljanja kliničke sumnje na BPJ iznosi 89,83% (53/59), dok je prosječna seroprevalencija životinja u stadu bila 29,38% (208/708). Pregled po županijama prikazan je u Tablici 10., a distribucija seropozitivnih preživača na razini naselja na Slici 39.

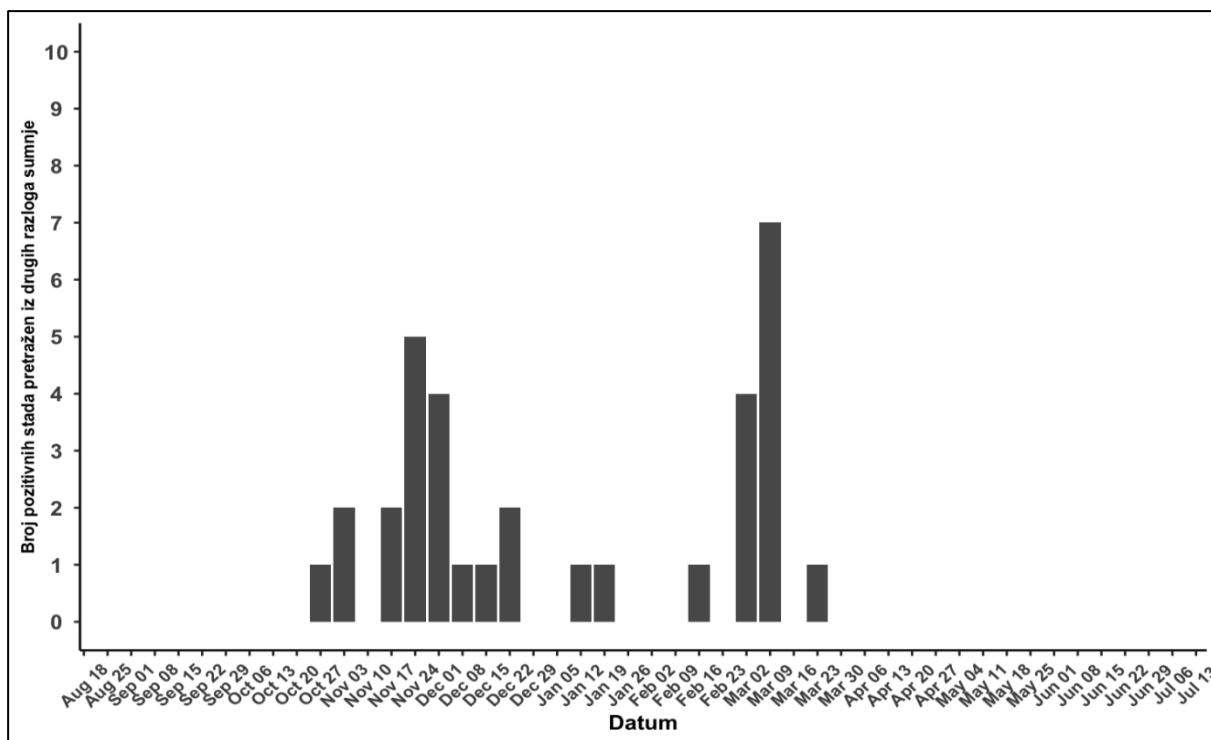
Tablica 10. Seropozitivna stada i životinje unutar pretraživanih županija tijekom kliničke faze epizootije

Županija	Broj pretraženih stada	Broj pozitivnih stada	Seropozitivno (%)	Broj pretraženih preživača	Broj pozitivnih preživača	Seropozitivno (%)
Dubrovačko-neretvanska	51	48	94,12	438	155	35,39
Šibensko-kninska	1	1	100,00	192	38	19,79
Splitsko-dalmatinska	4	3	75,00	50	14	28,00
Zadarska	3	1	33,33	28	1	3,57



Slika 39. Prikaz distribucije serološki pozitivnih preživača u odnosu na ukupnu seroprevalenciju na razini naselja tijekom kliničke faze epizootije

Zbog sumnje iz drugih razloga imunoenzimnim testom pretraženo je ukupno 585 stada te 1 124 životinje, od čega 177 životinja (110 ovaca, 55 koza i 12 goveda) iz 34 stada s pozitivnim rezultatom (Slika 40.).



Slika 40. Grafički prikaz serološki pozitivnih stada pretraženih imunoenzimnim testom zbog sumnje iz drugih razloga tijekom 2014. i 2015. godine

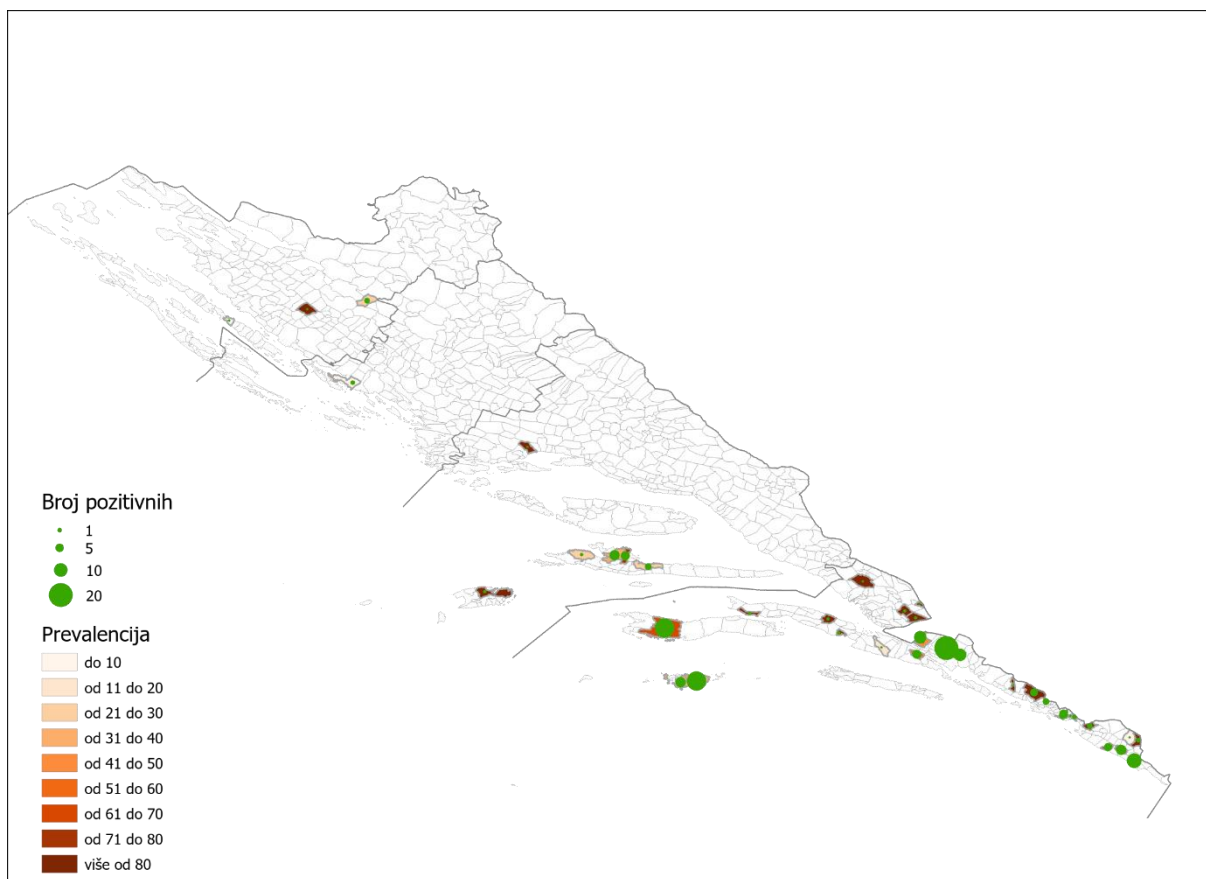
Serološki pozitivne životinje ponovno su uzorkovane radi daljnjeg molekularnog pretraživanja odnosno dokazivanja virusa BPJ u krvi. Zbog postavljene kliničke sumnje metodom RT-PCR pretraženo je 545 životinja iz 65 stada. Od toga je virus BPJ potvrđen u 64 stada te 196 životinja. Zbog sumnje iz drugih razloga metodom RT-PCR pretražene su ukupno 284 životinje iz 29 različitih stada, svi s negativnim rezultatom. Broj pretraženih i pozitivnih stada i životinja prema razlogu pretraživanja na razini godine i mjeseca prikazan je u Tablici 11., a na razini županije u Tablici 12. Distribucija potvrđenih slučajeva BPJ u preživača na razini naselja prikazana je na Slici 41.

Tablica 11. Rezultati pretraživanja stada i životinja metodom RT-PCR tijekom kliničke faze epizootije prema razlogu pretraživanja

Godina	Mjesec	Ukupno pretraženo stada	Ukupno pozitivno stada	Ukupno pretraženo životinja	Ukupno pozitivno životinja	Razlog pretraživanja
2014.	listopad	4	4	20	19	klinička sumnja
	studeni	30	30	201	109	klinička sumnja
		7	0	75	0	drugi razlozi
	prosinac	13	13	114	25	klinička sumnja
		6	0	45	0	drugi razlozi
2015.	siječanj	5	4	13	10	klinička sumnja
		2	0	116	0	drugi razlozi
	veljača	6	6	131	13	klinička sumnja
		10	0	36	0	drugi razlozi
	ožujak	7	7	66	20	klinička sumnja
		4	0	12	0	drugi razlozi

Tablica 12. Rezultati pretraživanja stada metodom RT-PCR na razini županije tijekom kliničke faze epizootije

Županija	Ukupno pretraženo stada	Ukupno pozitivno stada	Ukupno pretraženo stada klinička sumnja	Ukupno pozitivno stada klinička sumnja	Ukupno pretraženo stada drugi razlozi	Ukupno pozitivno stada drugi razlozi
Dubrovačko - neretvanska	48	47	48	47	10	0
Splitsko-dalmatinska	11	11	11	11	14	0
Zadarska	4	4	4	4	2	0
Šibensko-kninska	2	2	2	2	3	0

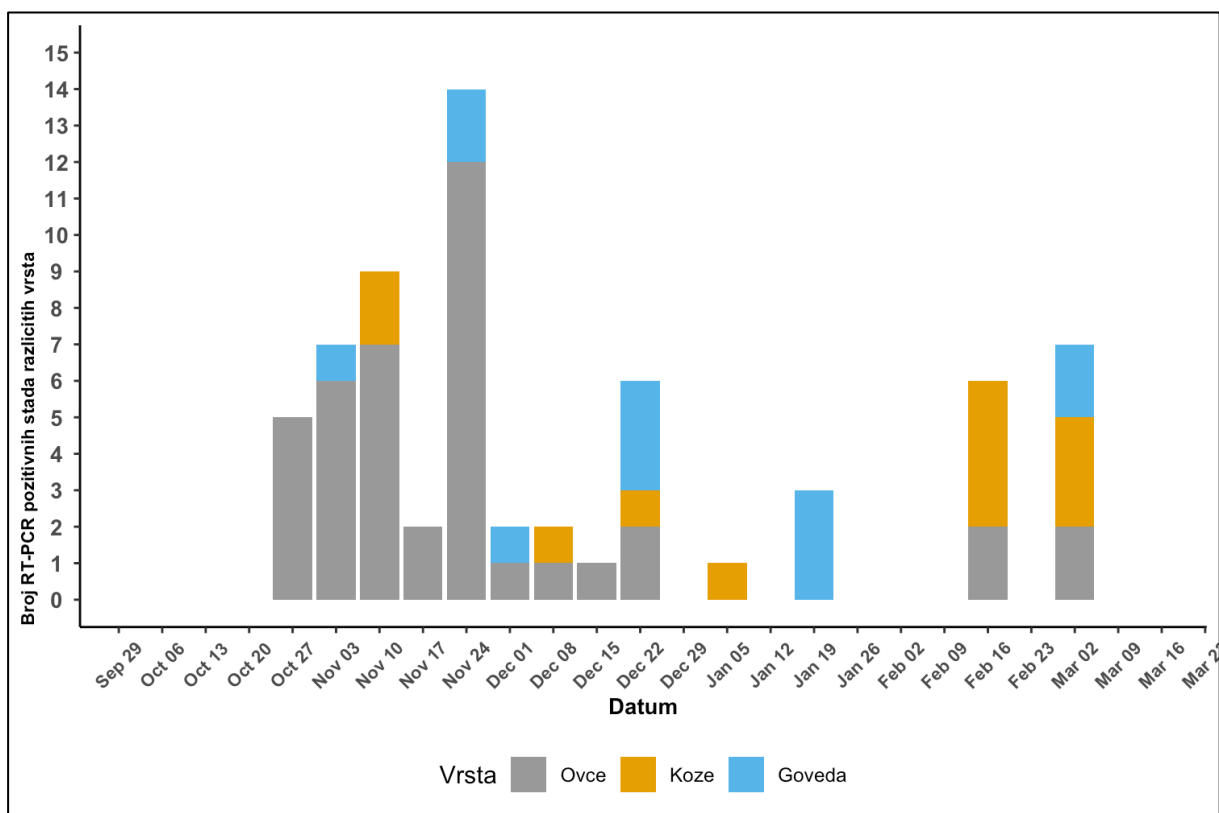


Slika 41. Prikaz distribucije potvrđenih slučajeva BPJ metodom RT-PCR u preživača u odnosu na ukupnu utvrđenu prevalenciju na razini naselja tijekom kliničke faze epizootije

Kako su svi uzorci prikupljeni radi sumnje iz drugih razloga metodom RT-PCR pretraženi s negativnim rezultatom, daljnja analiza podataka potrebna za određivanje mjera učestalosti provedena je samo na životinjama i stadima uzorkovanim radi kliničke sumnje.

Prva potvrda BPJ 2014. godine zabilježena je u 43. tjednu (27. listopada) na temelju kliničke sumnje prijavljene u četiri stada. Prijave kliničke sumnje slijedile su u studenom, tijekom kojeg je ukupno pretraženo 36 stada te prosincu kada je ukupno pretraženo 18 stada. Vrhunac epizootije u 2014. godini zabilježen je u 47. tjednu kada je BPJ potvrđena u 13 stada. Pad broja potvrđenih slučajeva te usporavanje epizootije uočava se od 49. do 52. tjedna, kada se i bilježi posljednji slučaj BPJ u 2014. godini. BPJ ponovno se dijagnosticira u 2. tjednu 2015. godine. Pretraživanja uz otkrivanje novih pozitivnih slučajeva nastavljaju se tijekom veljače i ožujka, sa vrhuncem epizootije u 10. tjednu kada je BPJ potvrđena u 7 stada. Nakon toga slijedi pad

prijava sumnji i usporavanje epizootije s posljednjim potvrđenim slučajem BPJ od 10. ožujka 2015. godine. Posljednje pretraživanje provedeno je u 14. tjednu (18. travnja 2015.). Nakon toga tijekom razdoblja travanj - lipanj nije bilo prijave sumnji niti su zabilježeni novi slučajevi BPJ. Tjedna stopa incidencije izračunata je za svaku individualnu vrstu preživača te za stada preživača koja su bila pozitivna metodom RT-PCR na temelju datuma zaprimanja uzorka u laboratorij. Krivulja epizootije te tjedne stope incidencije pozitivnih stada individualne vrste preživača prikazana je na Slici 42.



Slika 42. Tjedna incidencija izražena kao broj BPJ pozitivnih stada za svaku pojedinu vrstu preživača tijekom kliničke faze epizootije

Tijekom prvih mjeseci epizootije BPJ u 2014. godini najveći broj pozitivnih životinja činile su ovce, dok je broj pozitivnih goveda i koza dominirao epizootijom u 2015. godini. Izuzevši listopad kada je BPJ prvi puta potvrđena, najviša mjesečna kumulativna incidencija zabilježena je tijekom mjeseca studenog 2014. godine (Tablica 13.).

Tablica 13. Podatci o kumulativnoj incidenciji (KI) na razini pretraženih stada i životinja po godini i mjesecima

Godina	Mjesec	Ukupno pretraženo stada	Ukupno pozitivna stada	KI stado (%)	Ukupno pretraženo životinja	Ukupno pozitivno životinja	KI životinja (%)
2014.	listopad	4	4	100	20	19	95
	studeni	36	30	83,33	253	109	43,08
	prosinac	18	13	72,22	182	25	13,74
2015.	siječanj	7	4	57,14	32	10	31,25
	veljača	16	6	37,50	252	13	5,16
	ožujak	11	7	63,64	90	20	22,22

Udio zaraženih stada preživača i životinja na području županije kao administrativne jedinice nije bio značajnije povezan s gustoćom gospodarstava i preživača (Tablica 14.).

Tablica 14. Usporedba zaraženih stada preživača i životinja sa gustoćom gospodarstava i ukupnom populacijom preživača na razini županije

Županija	Ukupno naselja	Ukupno stada preživača	Broj pozitivnih stada	Ukupno preživača	Broj pozitivnih preživača
Dubrovačko-neretvanska	137	489	48	7389	155
Šibensko-kninska	178	2380	1	69 434	38
Splitsko-dalmatinska	293	3094	3	62 780	14
Zadarska	199	2664	1	114 158	1

Tijekom kliničke faze epizootije od svih vrsta preživača pretraženih radi kliničke sumnje na BPJ pozitivan rezultat pretraživanja imunoenzimnim testom bio je utvrđen samo u ovaca. Uzimajući u obzir mali broj provedenih pretraživanja metodom RT-PCR, činjenicu da je u tom razdoblju u svih vrsta preživača i objektivno dokazan virus BPJ te visoku osjetljivost i specifičnost korištenog imunoenzimnog testa, za ustanovljenje relativne proporcije varijance na tri hijerarhijske razine korišteni su podatci koji uključuju rezultate laboratorijskog pretraživanja imunoenzimnim testom na ukupno 666 uzoraka krvi ovaca. Obradjeni podatci

uključuju uzorke s područja regije Dalmacija, a podatci o broju županija, naselja i stada te broju ovaca po hijerarhijskim razinama uključenim u pretraživanje navedeni su u Tablici 15.

Tablica 15. Broj županija, naselja, stada i ovaca uključenih u pretraživanje radi kliničke sumnje po hijerarhijskim razinama

Hijerarhijska razina	Ukupno pretraženo	Broj ovaca / hijerarhijskoj razini		
		Najmanji	Srednja vrijednost	Najveći
Županija	4	15	166,5	413
Naselje	25	3	26,6	192
Stado	51	2	13,1	192

Hijerarhijska logistička regresija s binarnim ishodom serološkog testiranja imunoenzimnim testom korištena je kako bi se ustanovila relativna proporcija varijance na tri hijerarhijske razine, na razini županije, naselja, i stada. Bez obzira na primijenjeni model i kombinaciju hijerarhijskih razina uključenih u pojedini model, rezultati analize varijance ukazuju kako je razina varijabilnosti najveća na razini županije (Tablica 16.).

Tablica 16. Rezultati analize varijance za četiri različita modela provedene na rezultatima imunoenzimnog testa ovaca pretraženih radi kliničke sumnje tijekom faze aktivne kontrole epizootije

	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
Razina	Varijanca	SP ¹	Varijanca	SP ¹	Varijanca	SP ¹	Varijanca	SP ¹
Županija	0,139	0,192	0,156	0,192	0,139	0,192	-	-
Naselje	0,072	0,088	-	-	0,072	0,088	0,162	0,102
Stado	<0,001	<0,001	0,038	0,067	-	-	<0,001	<0,001
Intercept	-1,018	0,297	-1,041	0,284	-1,018	0,297	-0,719	0,130

¹ Standardna pogreška

Uzorci pozitivni serološkim pretraživanjem imunoenzimnim testom dalje su serotipizirani virus neutralizacijskim testom. Serotipizacija je u početku rađena na svakom serološki pozitivnom uzorku, no na vrhuncu epizootije protokol više nije bio poštivan u naseljima u kojima je prethodno BPJ bila potvrđena te utvrđen serotip. Virus neutralizacijskim testom pretražen je i serotipiziran ukupno 381 uzorak. Podatci o izdvojenom serotipu virusa BPJ za 2014. i 2015. na razini županije prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Rezultati provedbe virus neutralizacijskog testa 2014. i 2015. godine

Godina	Županija	Serotip
2014.	Dubrovačko-neretvanska	4
	Šibensko-kninska	4
	Splitsko-dalmatinska	4
	Zadarska	4
2015.	Dubrovačko-neretvanska	1*, 4
	Šibensko-kninska	4
	Splitsko-dalmatinska	4

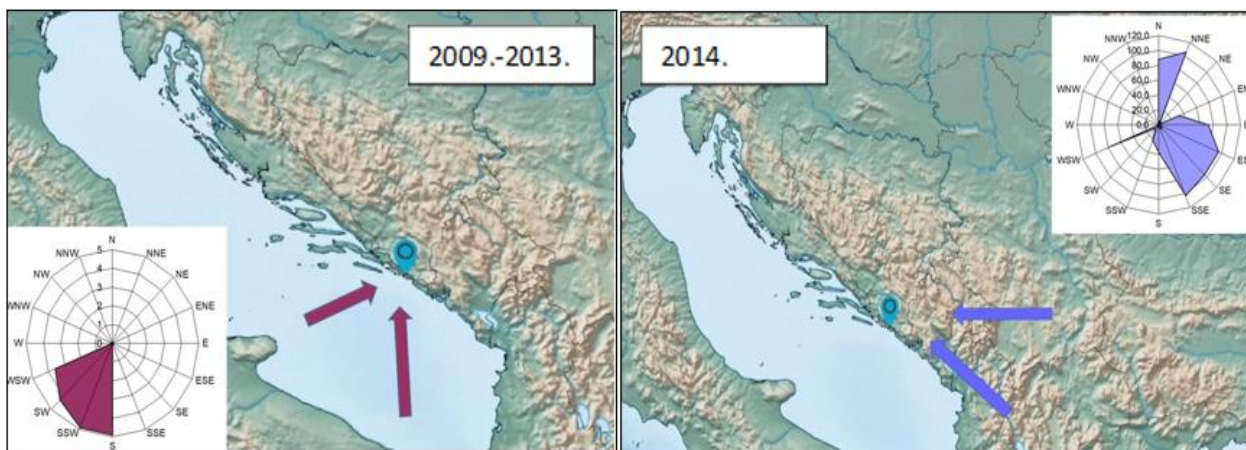
*Samo na otoku Lastovo

Na svim pretraženim gospodarstvima (57/57) te u svih vrsta preživača s područja Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske županije u 2014. godini potvrđena je cirkulacija virusa BPJ serotipa 4. Tijekom kliničke faze epizootije 2015. godine na svim pretraženim gospodarstvima (15/15) s područja Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske i Šibensko-kninske županije serotipizacijom je ponovno potvrđena cirkulacija BPJ serotipa 4. Dodatno, na 8 (8/15) gospodarstava u Dubrovačko-neretvanskoj županiji na otoku Lastovo, u naseljima Lastovo (4/8) i Uble (4/8) serotipizacijom je u ožujku 2015. godine dokazana i cirkulacija BPJ serotipa 1. Istovremena cirkulacija BPJ serotipa 4 i serotipa 1 dokazana je na 5 (5/8) gospodarstava. Na tim gospodarstvima najveći broj serotipiziranih i pozitivnih uzoraka potjecao je od koza (30/39), zatim goveda (6/39) te potom ovaca (3/39). Daljnjim pretraživanjima širenje BPJ serotipa 1 nije utvrđeno izvan granica otoka Lastova.

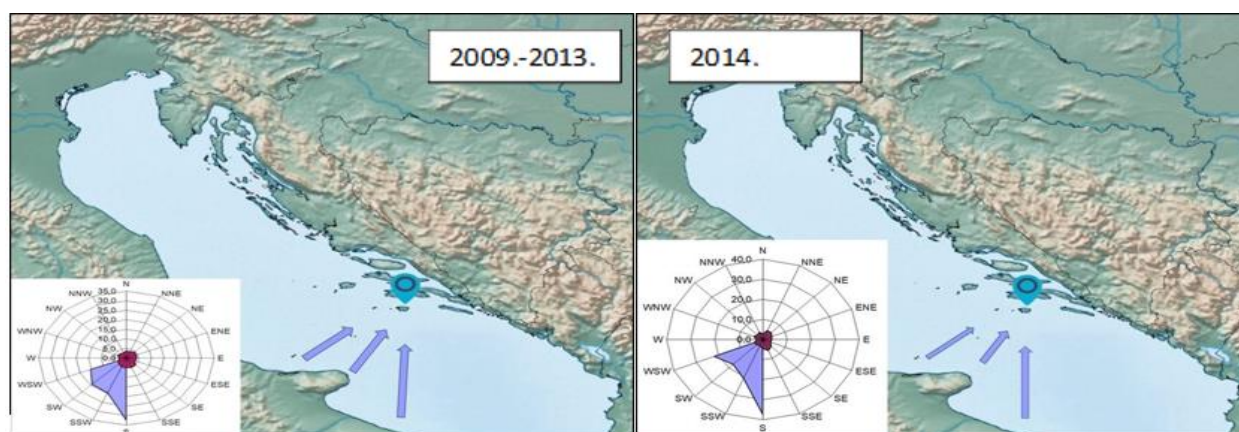
5.3.2. Klimatološki čimbenici

Cijela površina Hrvatske (100% površine) 2014. godine klimatološki je okarakterizirana kao ekstremno topla godina, a oborinske prilike na dijelu južnog Jadrana bile su u kategoriji kišno i vrlo kišno. Razdoblje zime 2014./2015. godine koje obuhvaća mjesec prosinac 2014., te siječanj i veljaču 2015. godine klimatološki je odstupalo od mjernog prosjeka te je okarakterizirano kao toplo/vrlo toplo te kišno razdoblje.

Godišnje razdiobe brzine vjetra u ovisnosti o relevantnom smjeru vjetra za razdoblje od 2009.-2013. i za 2014. godinu prikazane su grafički na ružama vjetrova za mjernu postaju Dubrovnik (Slika 43.) te mjernu postaju Lastovo (Slika 44).



Slika 43. Ruža vjetrova za mjernu postaju Dubrovnik tijekom razdoblja od 2009.-2013. i 2014. godine



Slika 44. Ruža vjetrova za mjernu postaju Lastovo tijekom razdoblja od 2009.-2013.i 2014. godine

Na području obje mjerne postaje vjetrovi koji su puhali pripadaju glavnom južnom kvadrantu. Na mjernoj postaji Dubrovnik uočava se značajan porast relativne čestine i srednje brzine za vjetrove koji su puhali iz jugo istočnog međusmjera (smjer istok- sjevero istok, jugo istok), a na području mjerne postaje Lastovo za vjetrove koji su puhali iz smjera jugo zapadnog međusmjera (smjer jug – jugo zapad). Također, tijekom proljeća 2014. godine prema podacima DHMZ-a o praćenju i ocjeni klime u 2014. godini razmjerno je velik broj dana bio obilježen jakim vjetrovima tj. tipovima vremena koji pripadaju u tzv. vjetrovni režim. Statistička analiza utjecaja klimatoloških elemenata na pojavu i širenje BPJ od 01. lipnja 2014. do 01. srpnja 2015.

temeljena je na negativnoj binomijalnoj regresiji sa stohastičkim efektom županije. Izbor negativne binomijalne regresije temeljio se na vizualnoj inspekciji distribucije gdje je prosjek bio 0,276, a varijanca 1,32. Kako je pretpostavka osnovne Poisson distribucije da je prosjek jednak varijanci, to ovdje nije bio slučaj te je negativna binomijalna regresija korištena kao alternativa koja će omogućiti prilagodbu za prekomjernu disperziju. Deskriptivna statistika varijabli koje su korištene u analizi prikazana je u Tablici 18.

Tablica 18. Deskriptivna statistika klimatoloških i drugih čimbenika korištenih u epidemiološkoj analizi njihove povezanosti s brojem slučajeva BPJ na razini županije

Čimbenik	Prosjek	Standardno odstupanje (SD)	Min.	25% percentil	Medijan	75% percentil	Max.
temp.prosjek* (°C)	16,73	6,14	5,3	10,78	18	22,23	26,31
tempmin.prosjek* (°C)	12,29	5,87	0,35	6,72	13,33	17,44	22,86
tempmax.prosjek* (°C)	20,76	6,4	7,71	14,51	21,22	26,92	30,71
vлага.prosjek* (%)	64,95	10,89	37,26	55,79	64,71	72,61	88,73
brzina vjetra.prosjek* (km/h)	26,65	7,83	13,82	20,92	25,21	30,25	52,95
oborine.prosjek* (mm/m ²)	6,19	7,54	0	0,78	3,46	8,55	34,84
oborine.sum [†] (mm/m ²)	46,06	52,84	0	5,51	24,24	58,22	243,9
stupanj dan.prosjek*	4,23	1,05	1,65	3,5	4,15	4,9	7,21
stupanj dan.sum [†]	29,05	7,52	9,35	24,1	28,6	34,05	50,25
četverotjedni.kumulativ [‡] (N)	1,16	3,36	0	0	0	0	25
pozitivna stada.sum [†] (N)	0,27	1,18	0	0	0	0	11

* Prosjek je izračunat kao tjedni aritmetički prosjek dnevnih vrijednosti u županiji (npr. prosječne, ili maksimalne dnevne temperature)

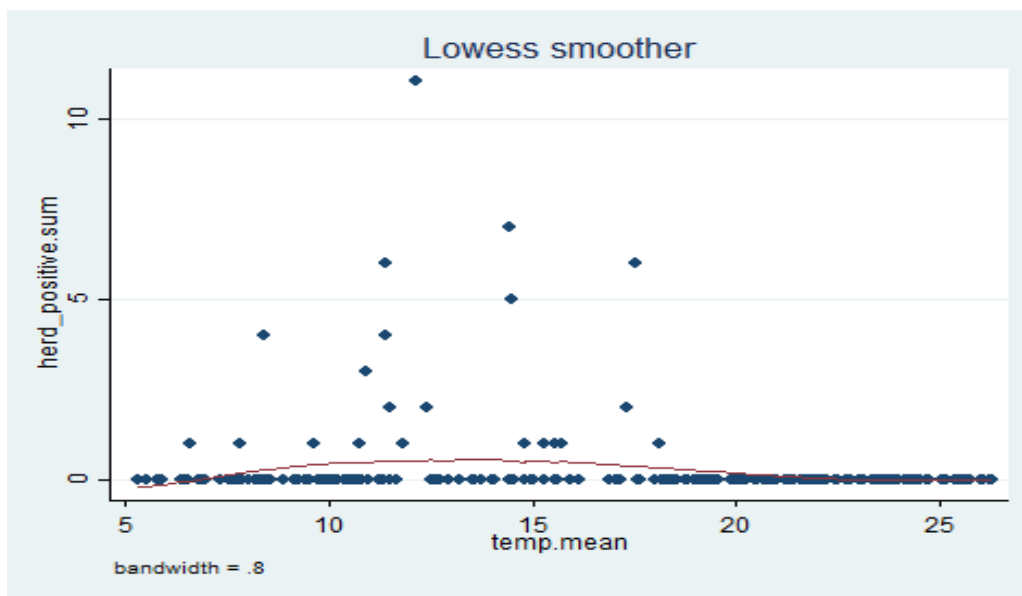
† Suma je izračunata kao tjedna suma dnevnih vrijednosti u relevantnom tjednu u županiji

‡ Izračunato kao suma broja pozitivnih stada u županiji u protekla četiri tjedna

Tijekom univarijabilne analize, potvrđena je statistički značajna povezanost prosječne tjedne temperature s brojem novih slučajeva u županiji, kada je prosječna tjedna temperatura izražena kao kategorijska varijabla (Tablica 19.). Kada su specifični percentili uspoređeni s osnovnom razinom (tj. prvim kvantilom i vrijednostima u 0-25% svih vrijednosti prosječnih temperatura), utvrđeno je da su vrijednosti prosječne tjedne temperature u drugom kvantilu povezane sa statistički značajnim povećanim rizikom i brojem novih slučajeva u županiji (Tablica 19). Broj slučajeva je 4,18 puta veći kada srednja dnevna temperatura poraste na 18⁰ C (Tablica 19.). Statistički značajna povezanost nije utvrđena za vrijednosti prosječne tjedne temperature iz trećeg i četvrtog kvantila. Takva povezanost i nelinearni odnos se također može uočiti i na grafikonu koji pokazuje rezultat Loess neparametrijskog izgladivanja uspoređujući broj slučajeva BPJ sa srednjom tjednom temperaturom (Slika 44.).

Tablica 19. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima srednje dnevne temperature u univarijabilnoj analizi.

Pozitivno stada. sum (0-25 percentil)	Relativni rizik (RR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)	
Temp.prosjek (0-25 percentil)	Osnovna razina	-	-	
temp.prosjek (25-50 percentil)	4,18	0,026	1,18	14,73
temp. prosjek (50-75 percentil)	0,10	0,058	0,01	1,07
temp. prosjek (75-100 percentil)	< 0,001	0,999	0	n/p
Ukupna p-vrijednost 0.0038				

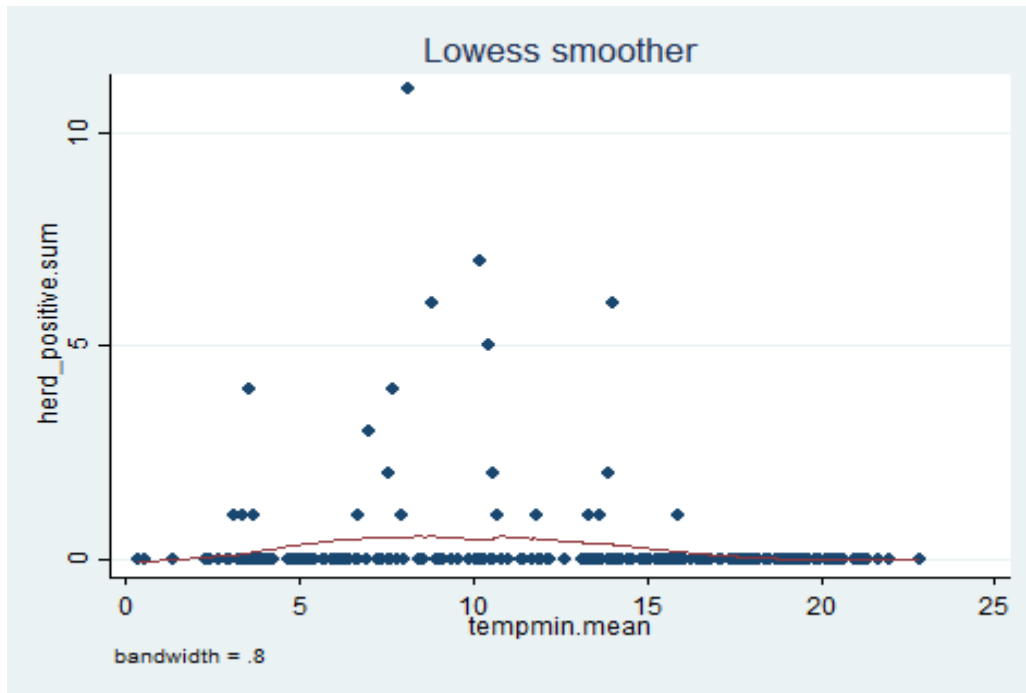


Slika 44. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije

Iako je vizualizacija prosječne minimalne tjedne temperature ukazivala na sličnu prirodu povezanosti (Slika 45.), univarijabilna analiza koja je koristila kategorijske varijable temeljene na kvantilima prosječne minimalne tjedne temperature nije utvrdila statističku značajnost ($p = 0,413$). Međutim, uključivanje prosječne minimalne tjedne temperature kao linearne varijable u model rezultiralo je statistički značajnom povezanosti. Potonjim modelom utvrđeno je da kako raste prosječni tjedni temperaturni minimum očekivani broj slučajeva u županiji pada za faktor 0,84, odnosno smanjuje se za 84% od bazne vrijednosti (Tablica 20.)

Tablica 20. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječnog tjednog temperaturnog minimuma u univarijabilnoj analizi

pozitivna stada.sum	Relativni rizik (RR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)	
tempmin.prosjek	0,84	0,005	0,74	0,94

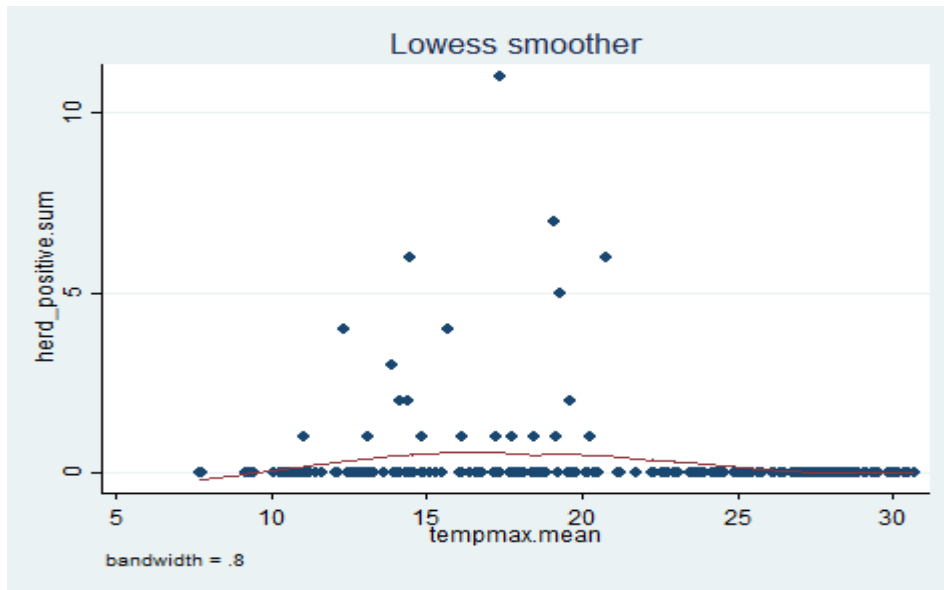


Slika 45. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne minimalne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije

Slično tome, iako je vizualizacija maksimalne prosječne tjedne temperature ukazivala na sličnu prirodu povezanosti (Slika 46.), univarijabilna analiza koja je koristila kategorijske varijable temeljene na kvantilima maksimalne temperature nije utvrdila statističku značajnost ($p > 0.05$). Međutim, uključivanje prosječne maksimalne tjedne temperature kao linearne varijable u model rezultiralo je statistički značajnom povezanosti. Potonjim modelom utvrđeno je da kako raste prosječni tjedni temperaturni maksimum očekivani broj slučajeva u županiji pada za faktor 0,80, odnosno smanjuje se za 80% od osnovne vrijednosti (Tablica 21.)

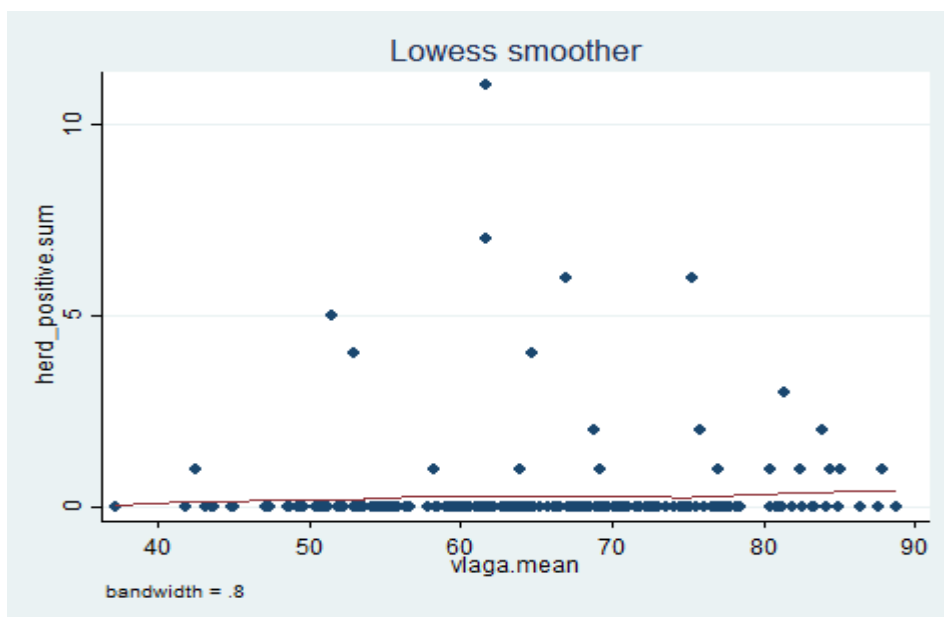
Tablica 21. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima maksimalne dnevne temperature u univarijabilnoj analizi

Pozitivna stada.sum	Relativni rizik (RR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)	
tempmax. prosjek	0,8	0,002	0,69	0,92

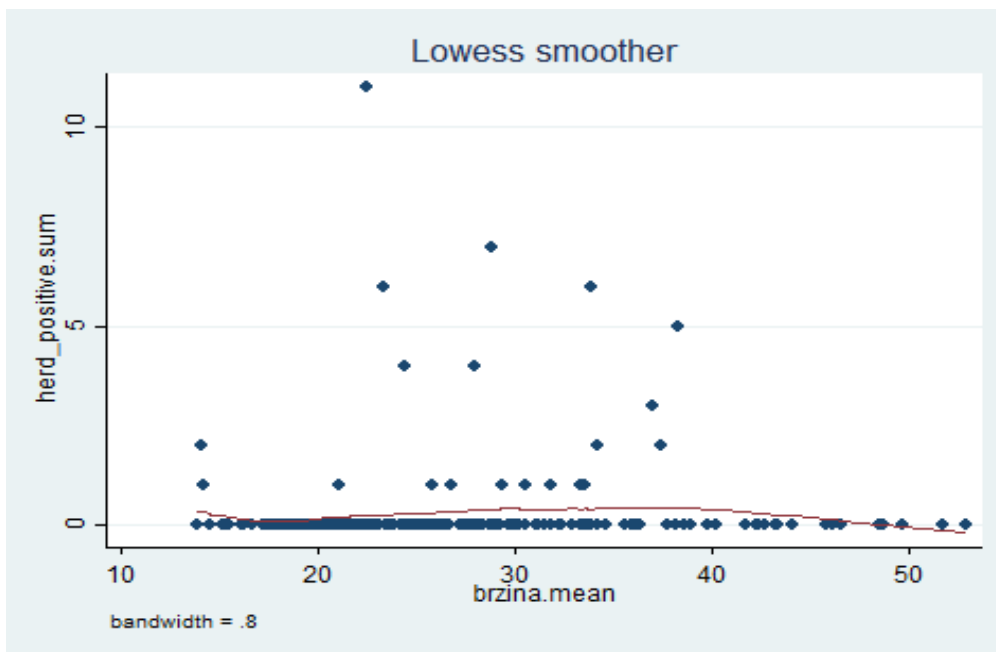


Slika 46. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne maksimalne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije

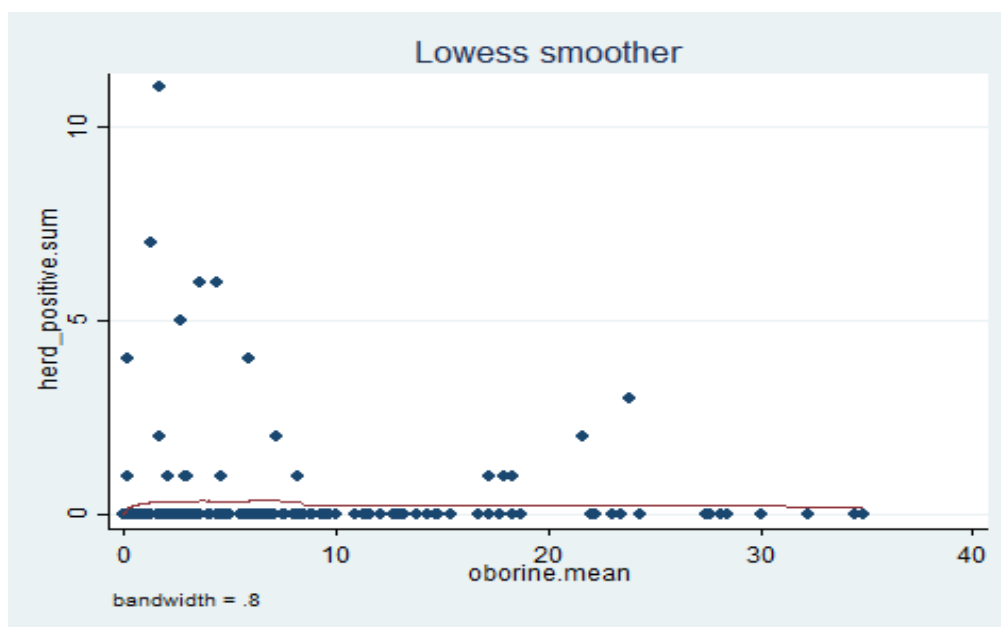
Usporedba kategorijskih i linearno kvantitativnih varijabli za srednju vrijednost vlage (Slika 47.), oborine (Slika 48.) i brzinu vjetra (Slika 49.) nije pokazala statistički značajnu povezanost s slučajevima BPJ. Slično tome, statistička povezanost se nije mogla utvrditi univarijabilnim modelom, niti kao kategorijska niti linearna varijabla.



Slika 47. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima vlage metodom LOESS neparametrijske regresije



Slika 48. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa brzinom vjetra metodom LOESS neparametrijske regresije



Slika 49. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa oborinama metodom LOESS neparametrijske regresije

Usporedba linearno kvantitativnih varijabli za četverotjedni kumulativ slučajeva BPJ u županiji koji je prethodio tjednu od interesa pokazala je statistički značajnu povezanost s slučajevima BPJ. Analiza pokazuje da kako u prethodna četiri tjedna raste broj slučajeva u županiji, tako se očekivani broj slučajeva u narednom razdoblju povećava za 1,69 puta (Tablica 22.).

Tablica 22. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima četverotjednog kumulativa u univarijabilnoj analizi

Pozitivna stada.sum	Relativni rizik		95% Interval pouzdanosti	
	(RR)	p	(CI)	
četverotjedni kumulativ	1,69	<0,001	1,39	2,17

Varijable koje su bile uključene u završni multivarijabilni regresijski model uključivale su četverotjedni kumulativ, te kategorijski efekt prosječne tjedne temperature. Iako je magnituda relativnog rizika bila smanjena u odnosu na univarijabilnu analizu, kvalitativni zaključci su bili identični rezultatima univarijabilne analize za ove dvije varijable. Npr., kako se u županiji povećava temperatura u drugom kvantilu, tako se broj očekivanih slučajeva povećava za 2,44 puta (Tablica 23.).

Tablica 23. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima četverotjednog kumulativa i temperaturnim prosjekom u multivarijabilnoj analizi

Pozitivna stada.sum	Relativni rizik		p*	95% Interval pouzdanosti	
	(RR)	p		(CI)	
četverotjedni kumulativ	1,32	0,003	-	1,09	1,59
prosjeak temperature			0.013		
temp.prosjeak_0	-	-	-	-	-
temp.prosjeak_1	2,44	0,107	-	0,82	7,25
temp.prosjeak_2	0,25	0,233	-	0,02	2,39
temp.prosjeak_3	7.18e-09	0,998	-	0	-

AIC= 173.6, broj opservacija=213, p-vrijednost modela = 0.002

*test omjera vjerojatnosti za ukupnu p-vrijednost kategorijske varijable testirane kao grupa

5.3.3. Podatci o premještanjima životinja

Analizom podataka prijavljenih premještanja u JRDŽ - bazi Jedinственog registra goveda na područje Dubrovačko-neretvanske županije tijekom 2014. godine nisu zabilježeni dolasci životinja iz drugih država niti su životinje bile premještane iz te županije izvan granica Republike Hrvatske. Kod premještanja na područje Dubrovačko-neretvanske županije zabilježen je samo jedan tip migracije označen kao „Dolazak s drugog gospodarstva“. Taj tip migracije odnosi se na dopremu životinja radi daljnjeg uzgoja. Ukupno je zabilježeno premještanje 896 životinja tijekom 96 dolaznih migracija. Od toga 91,74% životinja premještanje je unutar županije, a 8,26% životinja dopremljeno je s područja drugih županija (Tablica 24).

Tablica 24. Broj goveda prema županiji dopreme na područje Dubrovačko-neretvanske županije 2014. godine

Županija dopreme	Ukupno goveda
Dubrovačko-neretvanska	822
Splitsko-dalmatinska	61
Istarska	8
Osječko-baranjska	3
Bjelovarsko-bilogorska	2

Iz Dubrovačko-neretvanske županije na područje iste ili drugih županija premješteno je ukupno 606 goveda tijekom 283 migracije. Od toga 76,07% životinja premještanje je unutar županije, a 23,92% otpremano je na područja drugih županija. U svrhu klanja u druge županije je otpremljeno 41,34% životinja, a radi daljnjeg uzgoja 58,66% životinja (Tablica 25).

Tablica 25. Broj goveda prema županiji otpreme s područja Dubrovačko-neretvanske županije 2014. godine

Županija otpreme	Ukupan broj goveda
Dubrovačko-neretvanska	461
Ličko-senjska	73
Splitsko-dalmatinska	54
Grad Zagreb	17
Karlovačka	1

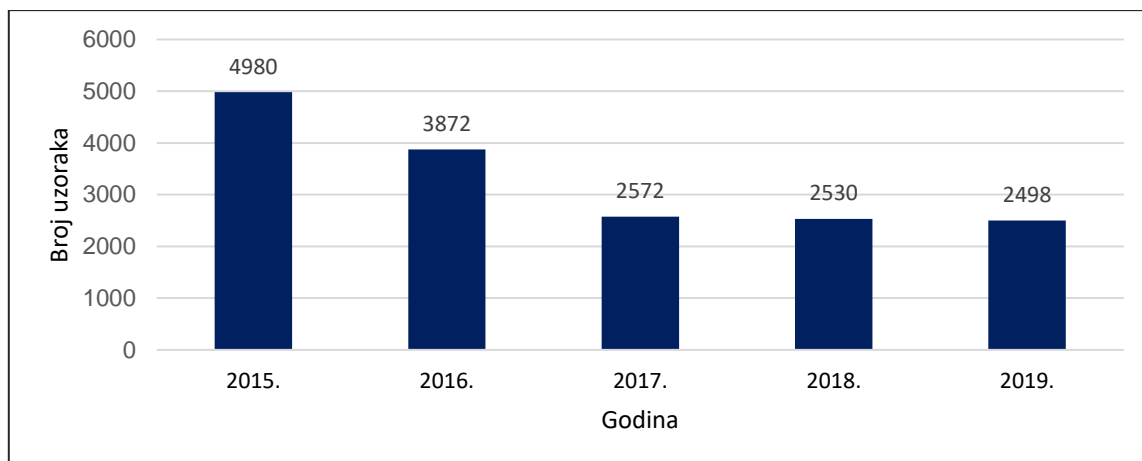
5.3.4. Entomološko istraživanje

Tijekom razdoblja kliničke faze epizootije nije provedeno entomološko istraživanje vektora BPJ te ne postoje podatci kojima se pratilo kretanje vrsta komarčića *Culicoides spp.* na području Hrvatske kao i utvrđivanje prisustva virusa BPJ u vektorima.

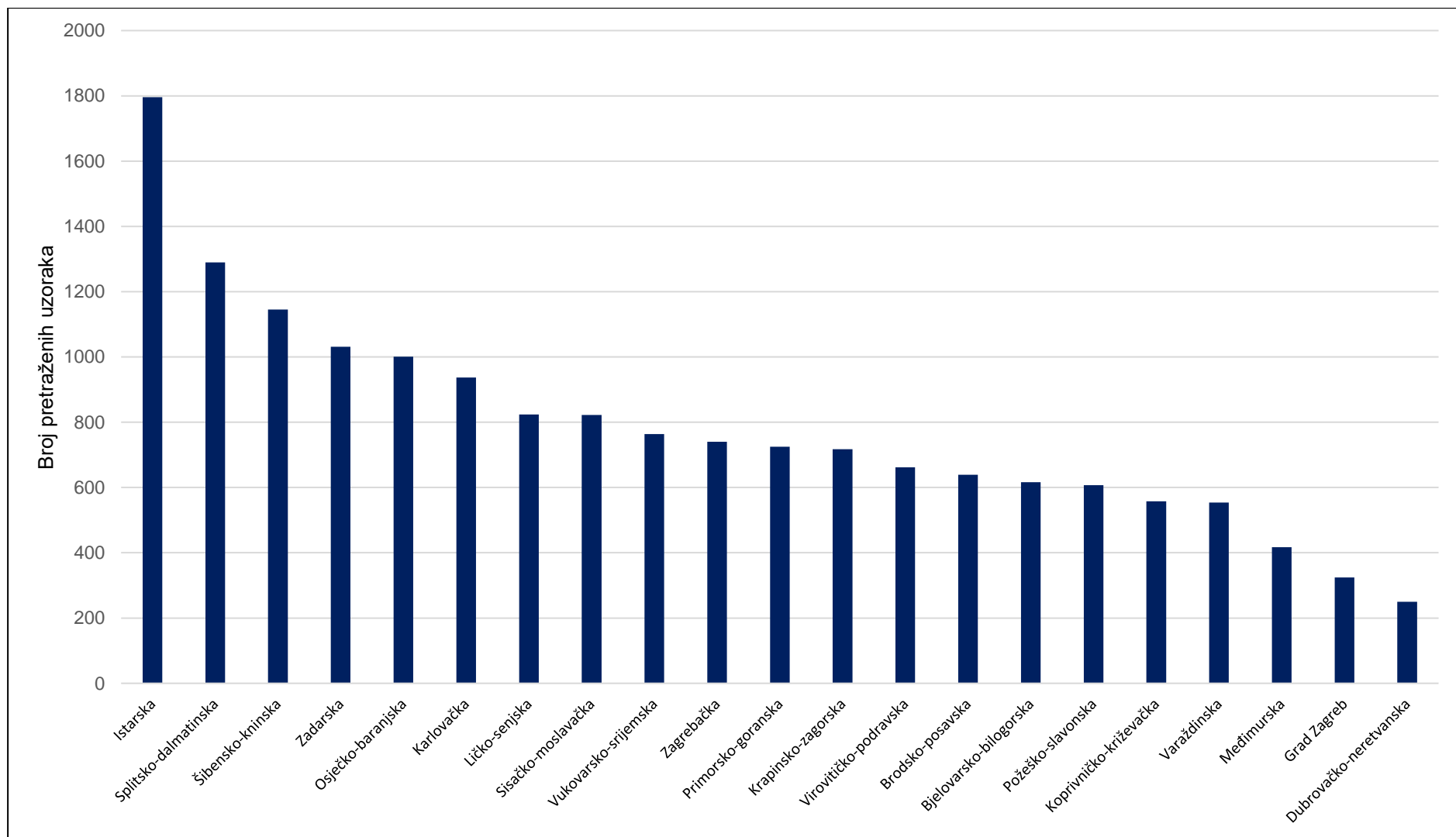
5.4. Deskriptivna statistika za razdoblje faze aktivne kontrole epizootije

5.4.1. Vremenska i prostorna distribucija mjera učestalosti (seroprevalencije, incidencije, kumulativne incidencije te stvarne prevalencije)

Analiza podataka faze aktivne kontrole epizootije provedena je na 16 452 uzorka seruma sentinel životinja pretraženih imunoenzimnim testom, prikupljenih s područja 21 županije, 1862 naselja i 3425 gospodarstva. Najveći broj uzoraka (30,26%) prikupljen je i laboratorijski pretražen 2015. godine, a najmanji 2019. godine (15,18%). Broj prikupljenih uzoraka po godini i županiji prikazuje se na Slikama 50. i 51.

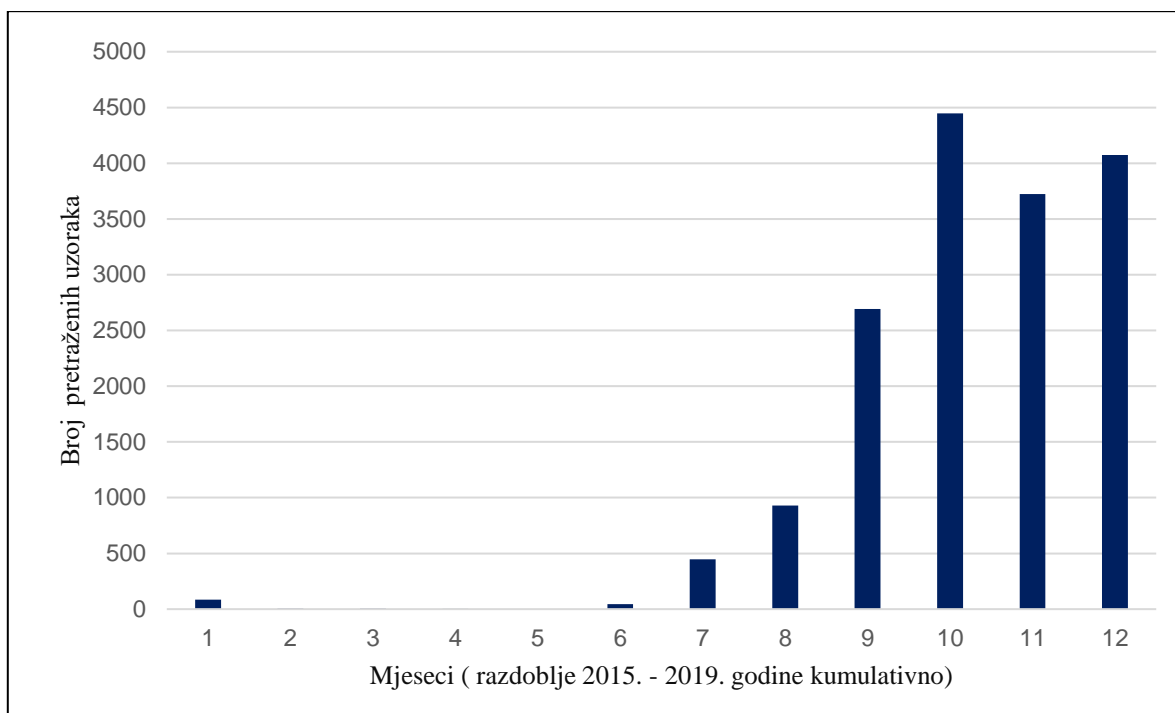


Slika 50. Grafički prikaz dinamike uzorkovanja radi pretraživanja imunoenzimnim testom ELISA tijekom faze aktivne kontrole epizootije



Slika 51. Grafički prikaz ukupnog broja pretraženih uzoraka po županiji tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije

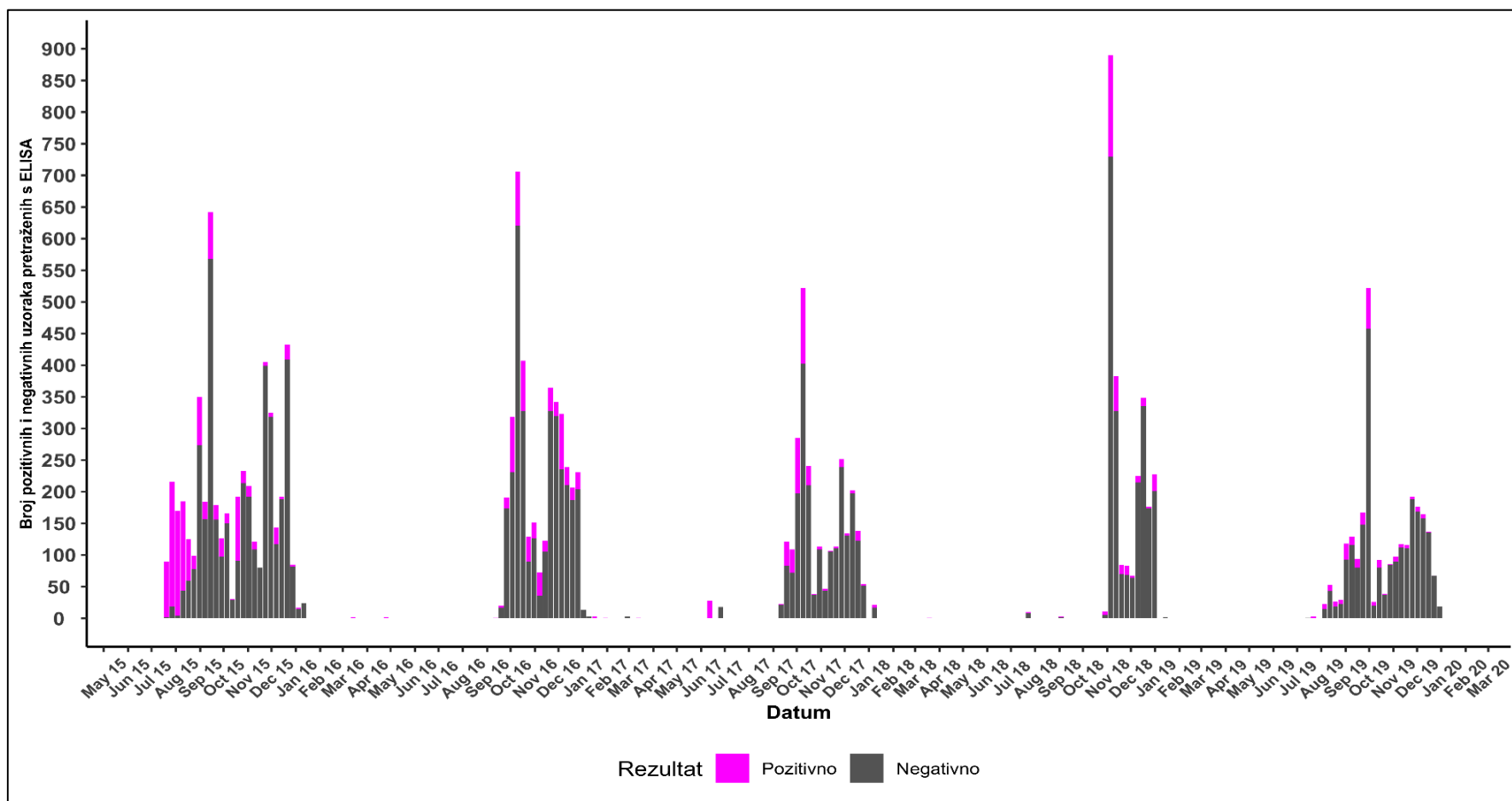
Uzorkovanja su bila najintenzivnija tijekom listopada i prosinca, a najnižeg intenziteta tijekom srpnja i kolovoza (Slika 52.).



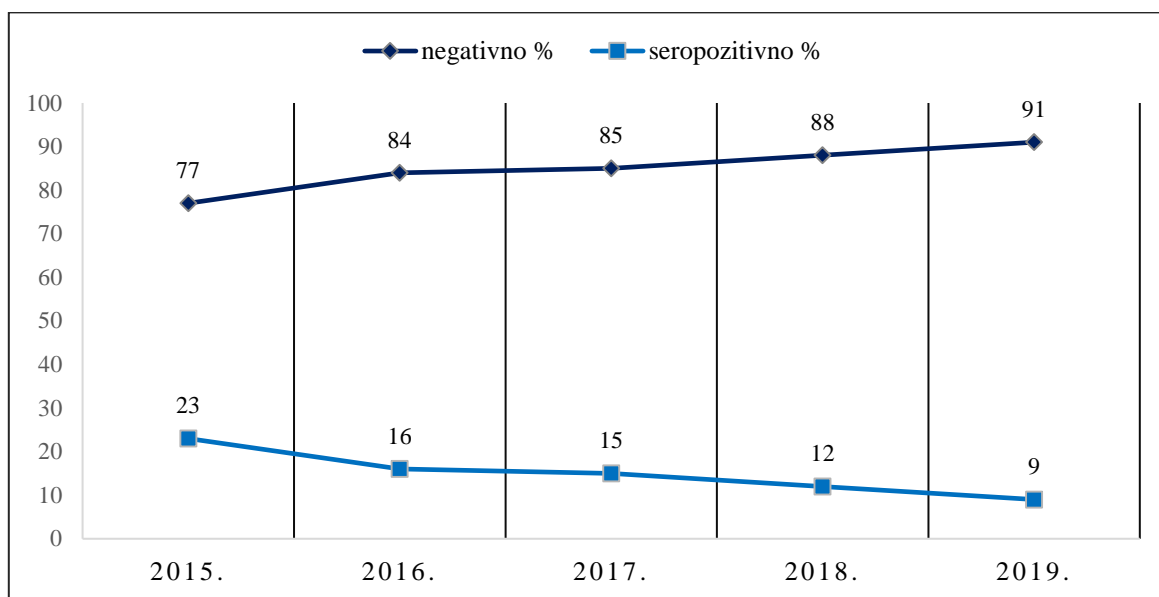
Slika 52. Grafički prikaz kumulativne mjesečne dinamike uzorkovanja i laboratorijskog pretraživanja uzoraka od 2015. do 2019. godine

U prosjeku je za potrebe provedbe programa nadziranja BPJ tijekom faze aktivne kontrole epizootije uzorkovano 4,8 sentinel životinja po gospodarstvu.

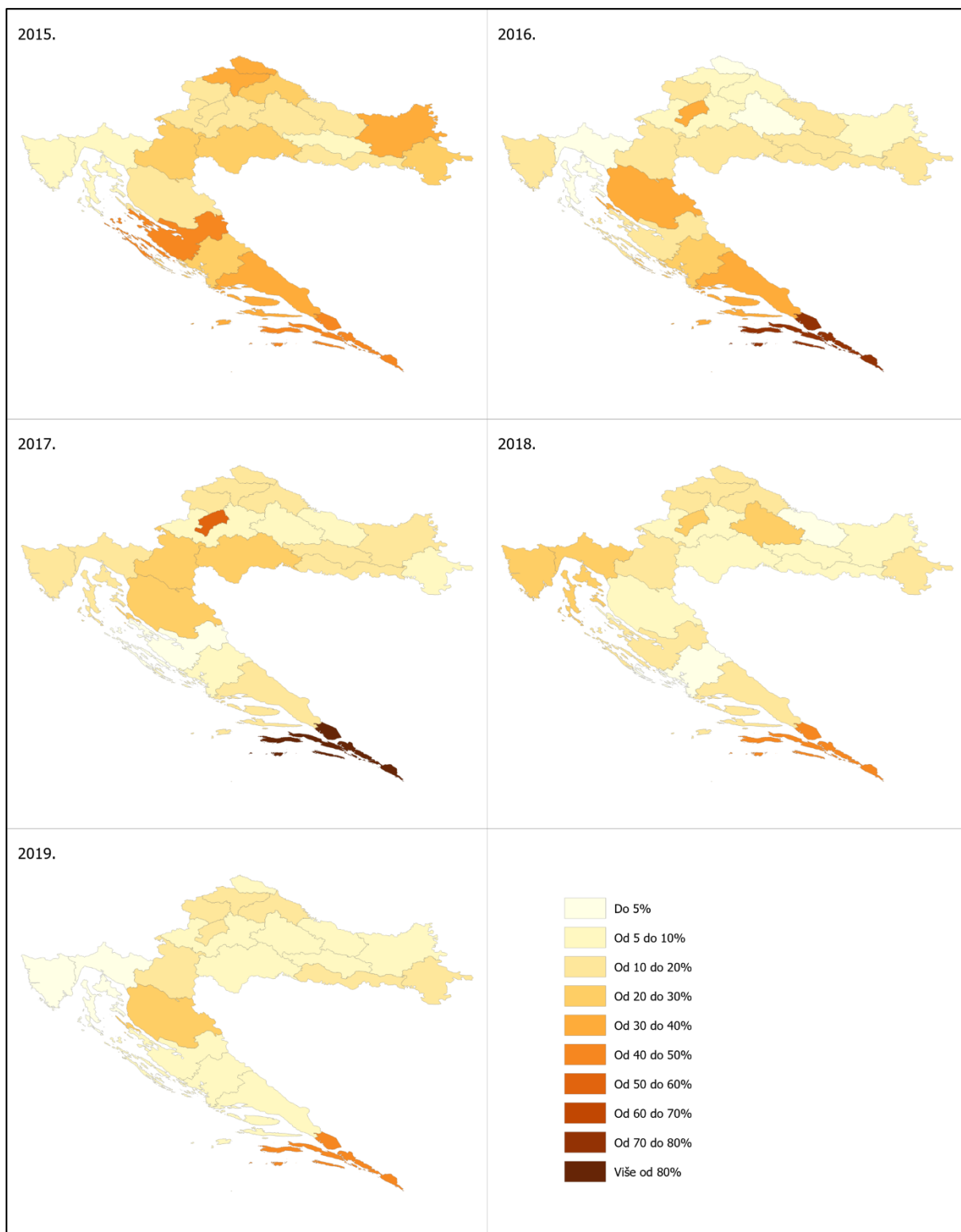
Najveći udio pozitivnih uzoraka u odnosu na ukupan broj utvrđen je 2015. godine, nakon čega se bilježi kontinuirani pad i broja pretraženih i broja pozitivnih uzoraka. Mjesečni i godišnji omjer negativnih i seropozitivnih uzoraka prikazuje se na Slikama 53. i 54., a seroprevalencija na razini županije i godine na Slici 55.



Slika 53. Grafički prikaz broja pozitivnih i negativnih uzoraka pretraženih imunoenzimnim testom mjesečno tijekom faze aktivne kontrole epizootije

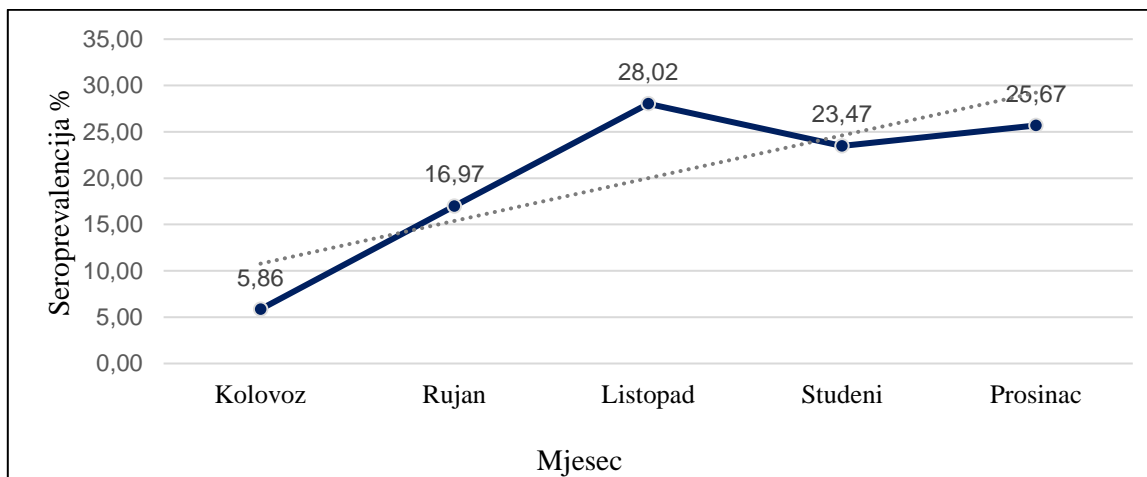


Slika 54. Grafički prikaz omjera negativnih i seropozitivnih uzoraka od 2015. do 2019. godine



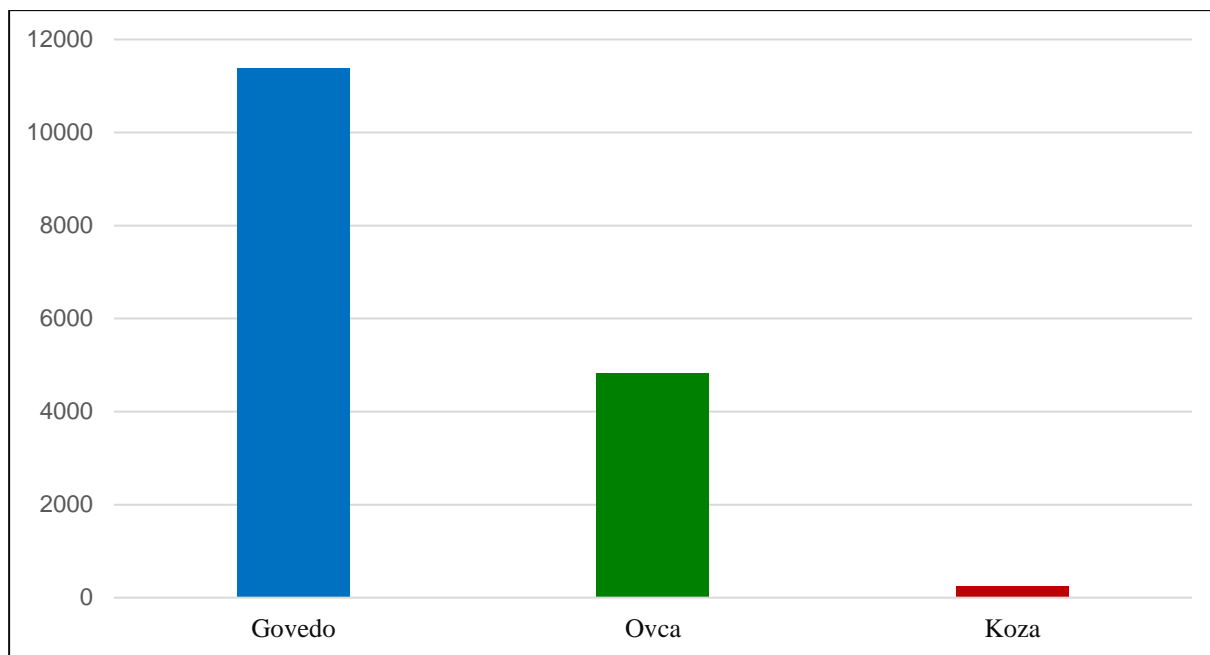
Slika 55. Prikaz utvrđene seroprevalencije na razini županije i godine za razdoblje od 2015. do 2019. godine

Gledano prema mjesečnoj distribuciji, tijekom faze aktivne kontrole epizootije najviša kumulativna seroprevalencija utvrđena je tijekom mjeseca listopada, a najniža tijekom mjeseca kolovoza (Slika 56.).

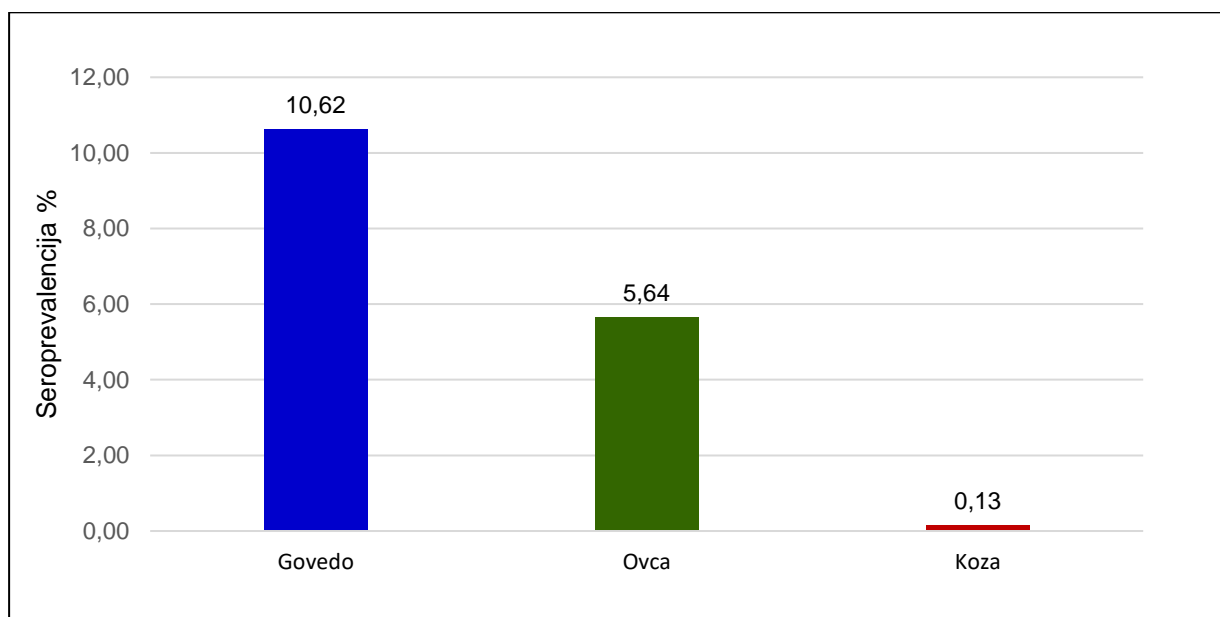


Slika 56. Trend kretanja kumulativne seroprevalencije prikazane na mjesečnoj razini tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije

Najveći postotak sentinel životinja činila su goveda 69,17% (11 380/16 452), potom ovce 29,17% (4816/16 452) i najmanji koze 1,56% (256/16 452). Omjer broja pretraženih i seropozitivnih uzoraka prema vrsti sentinel životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije prikazan je na Slici 57. i 58.

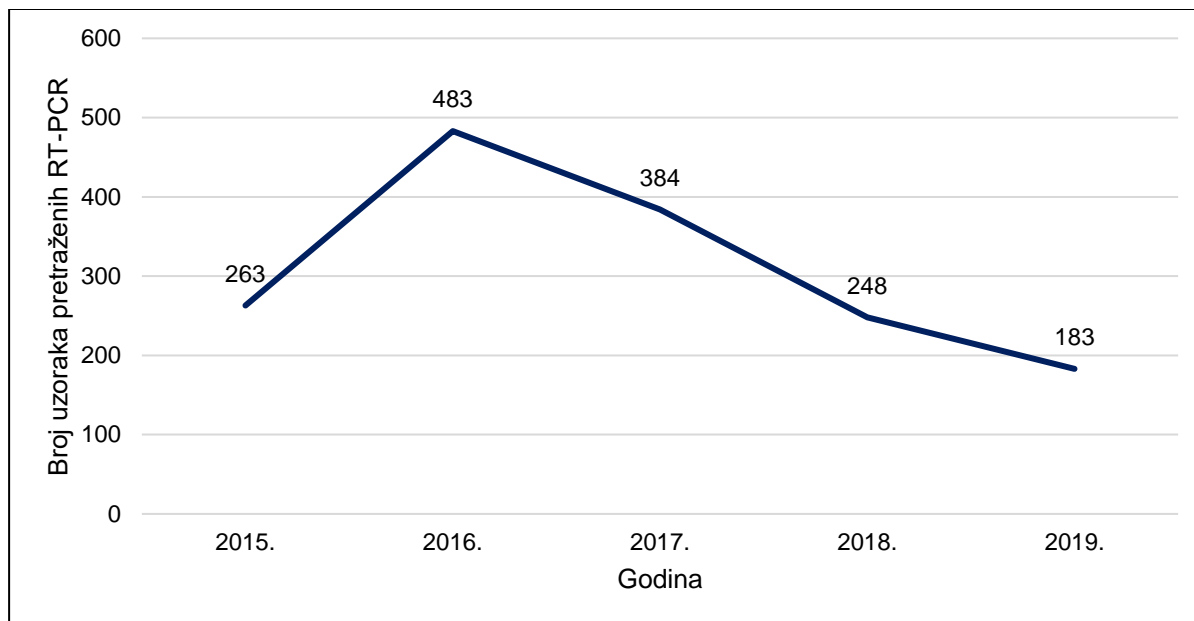


Slika 57. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka prema vrsti sentinel životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije



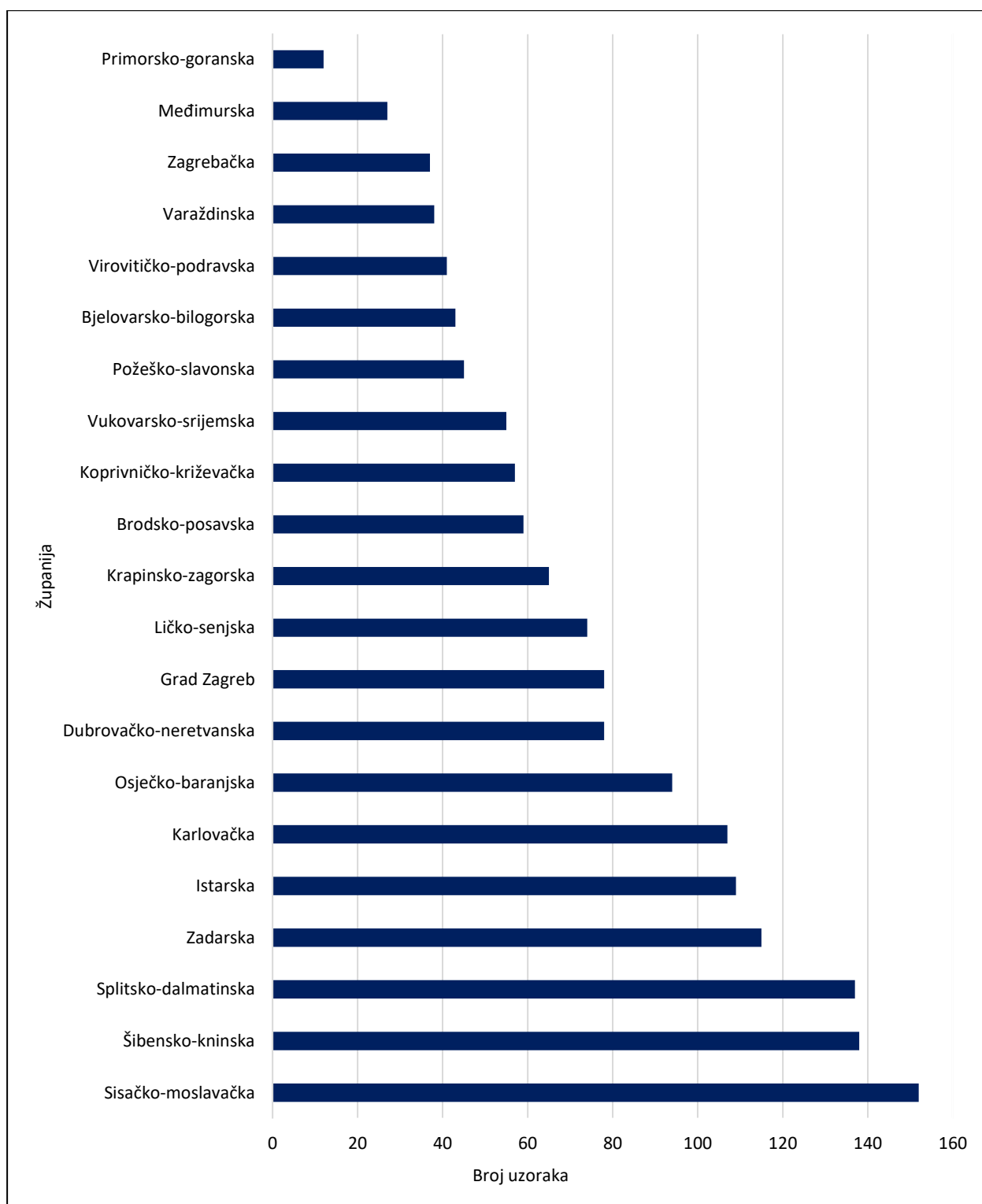
Slika 58. Grafički prikaz kumulativne seroprevalencije po vrsti životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije

Daljnja analiza podataka faze aktivne kontrole epizootije provedena je metodom RT-PCR na 1561 uzorku prikupljenom s područja 21 županije tijekom razoblja 2015. do 2019. godine (Slika 59.).



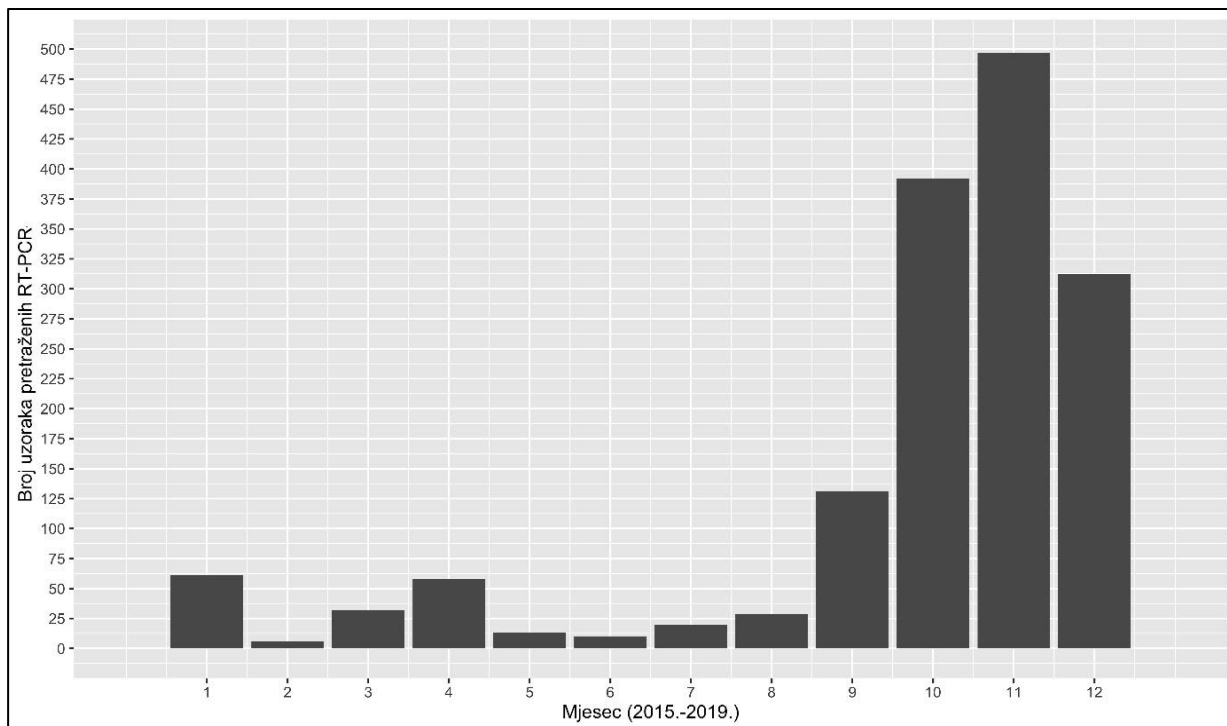
Slika 59. Grafički prikaz dinamike uzorkovanja i ukupnog broja uzoraka pretraženih metodom RT-PCR od 2015. do 2019. godine

Tijekom svih pet godina provedbe programa nadziranja najviše uzoraka 9,74% radi pretrage metodom RT-PCR dostavljeno je iz Sisačko - moslavačke županije (152/1561), a najmanje 0,77% iz Primorsko – goranske županije (12/156) (Slika 60.).



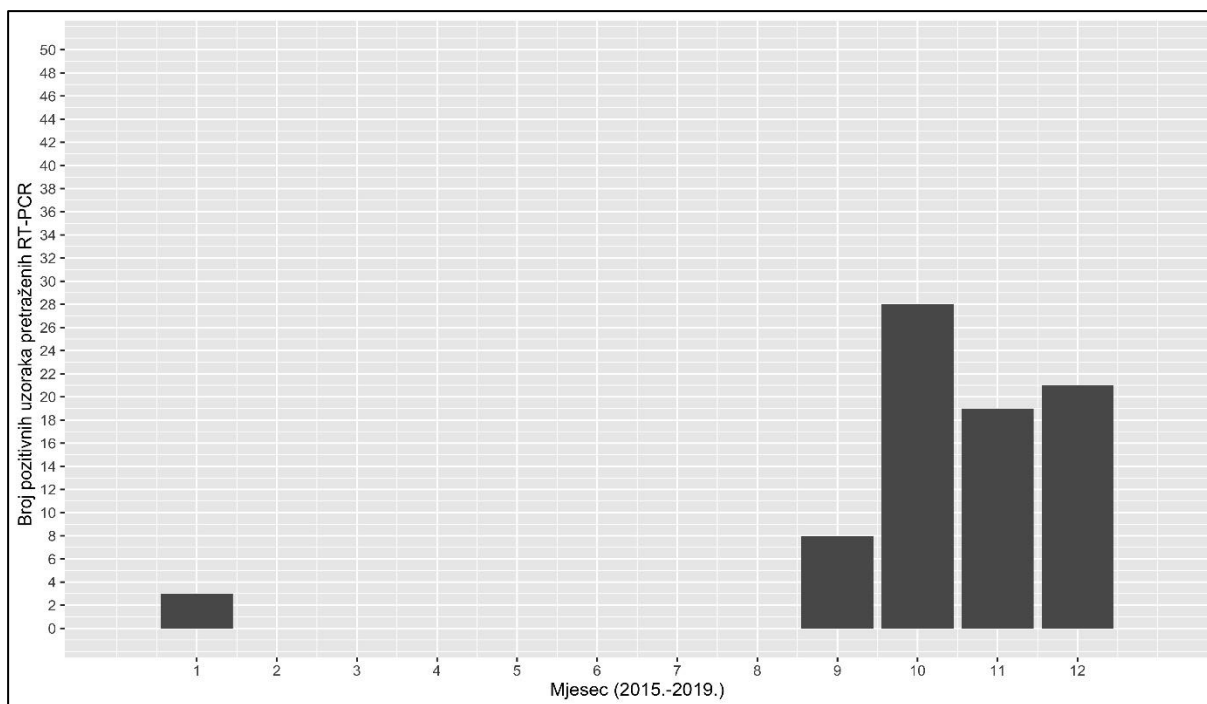
Slika 60. Ukupan broj uzoraka dostavljenih na laboratorijsko pretraživanje metodom RT-PCR po županiji tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije

Uzorkovanja i pretraživanja bila su najintenzivnija tijekom zadnjeg, IV kvartala godine (listopad, studeni i prosinac), a najnižeg intenziteta tijekom II kvartala godine (svibanj – kolovoz) (Slika 61.).



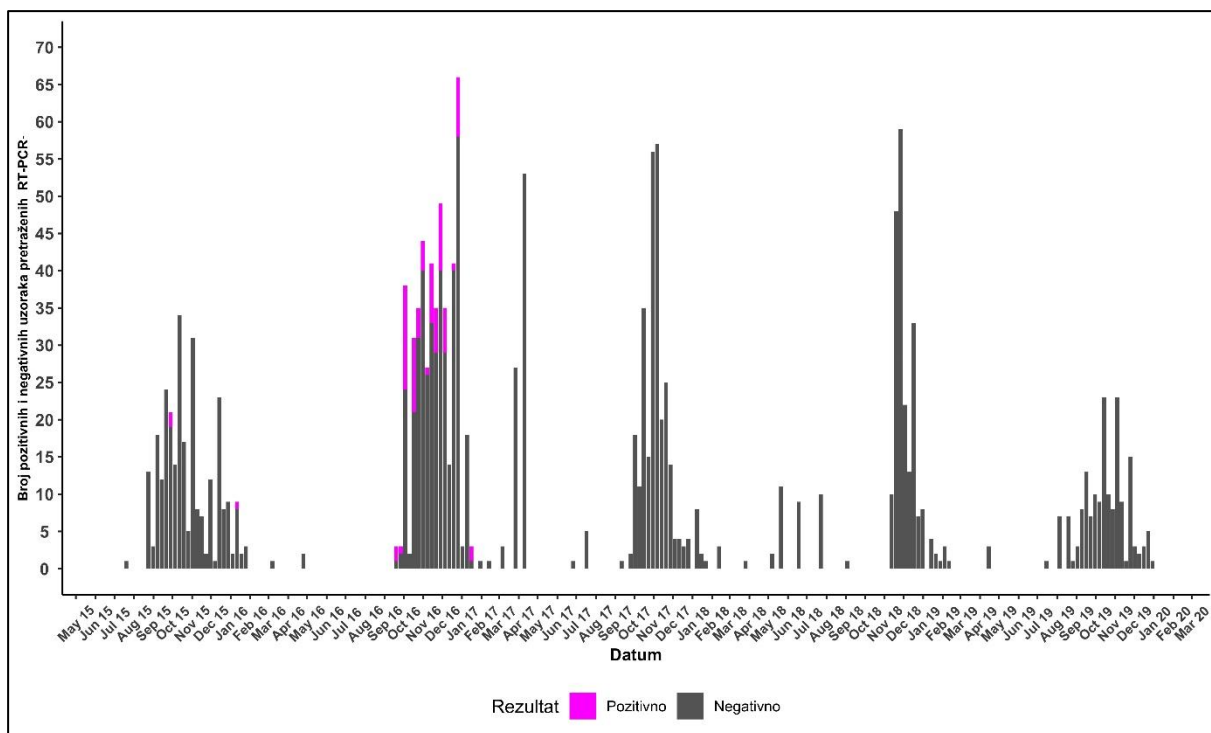
Slika 61. Grafički prikaz kumulativne mjesečne dinamike uzorkovanja i laboratorijskog pretraživanja metodom RT-PCR za razdoblje 2015. – 2019. godine

Od ukupnog broja uzoraka pretraženih metodom RT-PCR 5,06% (79/1561) bilo je pozitivno. Tijekom cjelokupnog razdoblja faze aktivne kontrole epizootije najveći broj pozitivnih uzoraka utvrđen je tijekom listopada, s tendencijom pada u studenom i prosincu., dok od 01. veljače do 31. kolovoza nije zabilježen niti jedan pozitivan slučaj BPJ (Slika 62.).

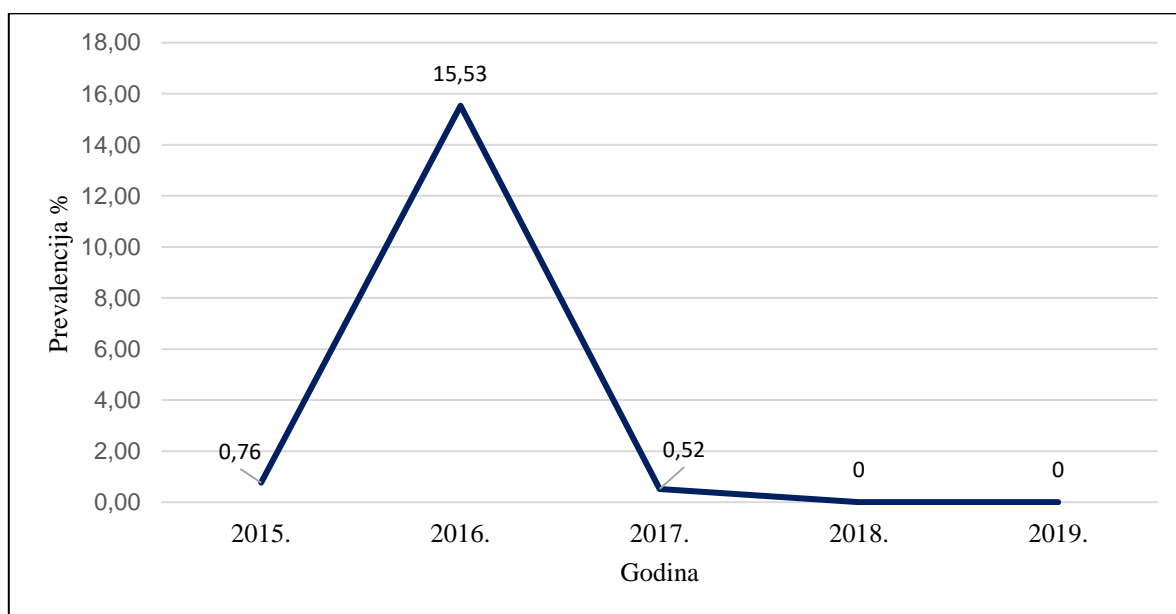


Slika 62. Grafički prikaz pozitivnih uzoraka metodom RT-PCR mjesečno za razdoblje 2015. – 2019. godine

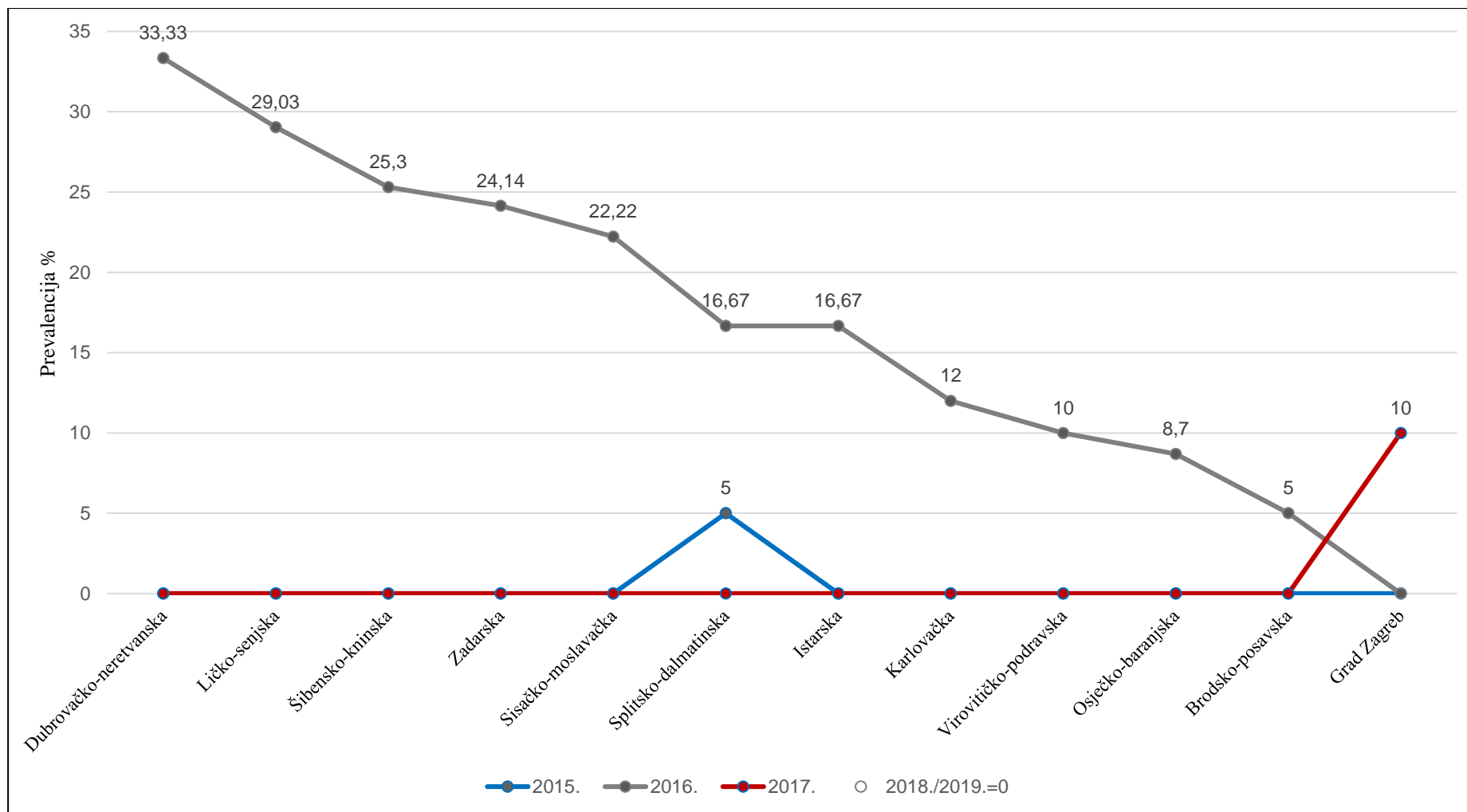
Udio pozitivnih uzoraka, ukupna godišnja prevalencija i prevalencija na razini županije po godini pretraživanja prikazani su na Slikama 63., 64., i 65.



Slika 63. Grafički prikaz ukupnog broja pretraženih i pozitivnih uzoraka metodom RT-PCR mjesečno od 2015. – 2019. godine



Slika 64. Grafički prikaz godišnje prevalencije BPJ na razini stada u razdoblju 2015. – 2019. godine



Slika 65. Grafički prikaz prevalencije po županijama i godini pretraživanja za razdoblje faze aktivne kontrole epizootije

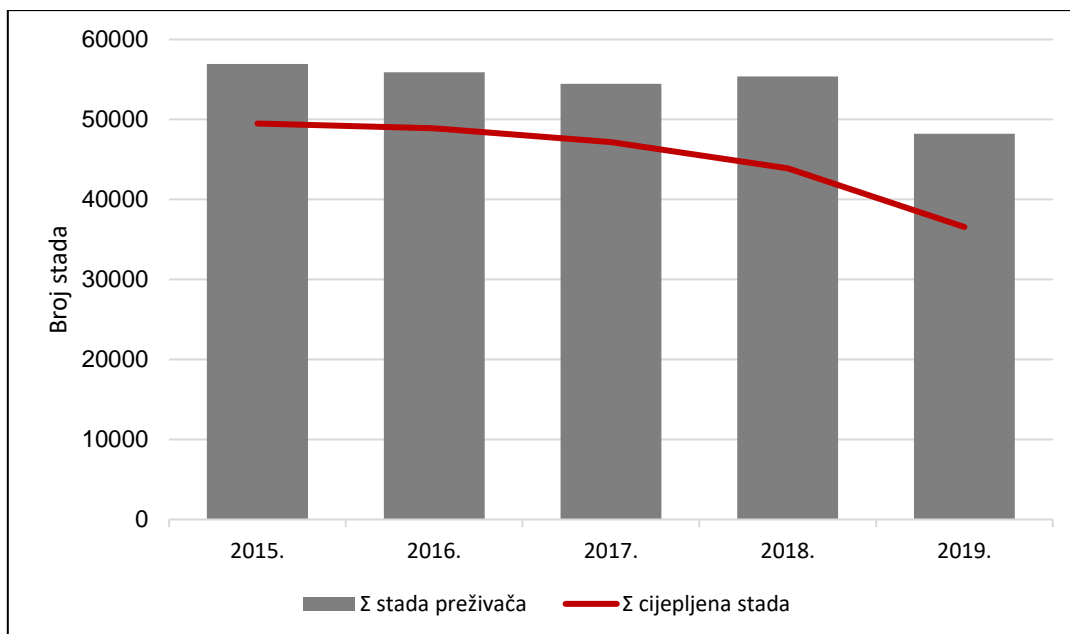
5.4.2. Cijepljenje

Tijekom svih pet godina provedbe mjere, cijepljenje životinja bilo je organizirano kroz masovne kampanje koje su provedene tijekom razdoblja siječanj – travanj čime se osigurao odgovarajući imunitet životinja prije sezone aktivnosti vektora. Cijepljenjem su bila obuhvaćena sva goveda, ovce i koze u zemlji, i to goveda i ovce uzastopno svake godine od 2015. do 2019., dok su koze cijepljenje od 2015. do 2018. godine. Od ukupno 4 969 557 cijepljenih životinja, analiza je obuhvatila 4 936 153 cijepljenih životinja dok su 33 404 životinje isključene jer nisu odgovarale postavljenoj definiciji.

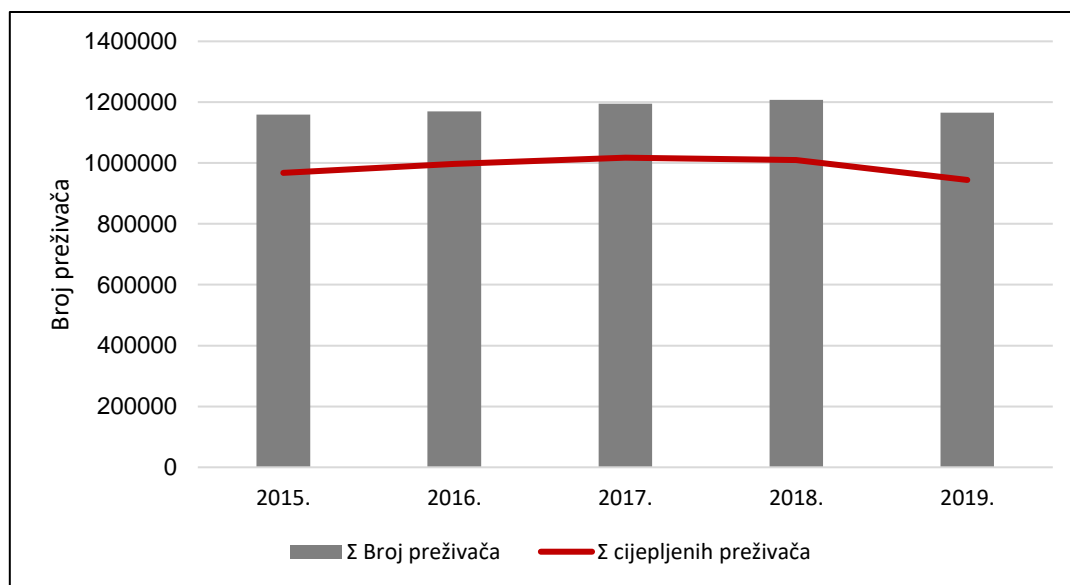
Prosječna kumulativna procijepljenost stada za razdoblje 2015. do 2019. iznosila je 88,93% (225 987/ 254 117), a preživača 84,55% (4 936 153/5 837 806), odnosno 96,73% u goveda (2 038 665/2 237 081), 77,40% ovaca (2 669 892/3 291 054) i 70,93% koza (227 596/309 671). Podatci o godišnjoj procijepljenosti stada i životinja prikazani su u Tablici 26. te na Slikama 66. do 68.

Tablica 26. Rezultati cijepljenja preživača od 2015. do 2019. godine

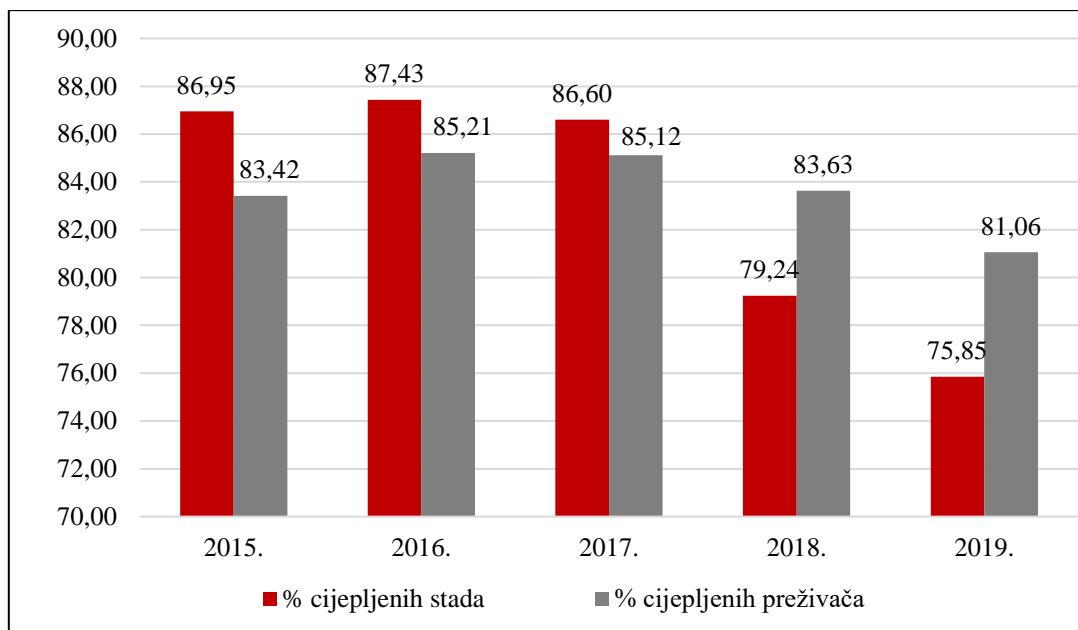
	Σ stada preživača	Σ cijepljena stada	% cijepljenih stada	Σ Broj preživača	Σ cijepljenih preživača	% cijepljenih preživača
2015.	56922	49495	86,95	1159561	967265	83,42
2016.	55918	48891	87,43	1169891	996821	85,21
2017.	54459	47164	86,60	1195430	1017556	85,12
2018.	55375	43879	79,24	1207864	1010088	83,63
2019.	48196	36558	75,85	1165069	944423	81,06



Slika 66. Grafički prikaz broja cijepjenih stada preživaca u odnosu na ukupan broj stada preživaca



Slika 67. Grafički prikaz broja cijepjenih preživaca u odnosu na ukupan broj preživaca



Slika 68. Grafički prikaz postotka cijepjenih preživaca u odnosu na postotak cijepjenih stada

Ukupni rezultati cijepjenja za svaku godinu provedbe mjere i vrstu cijepjenih životinja navedeni su za goveda u Tablici 27., ovce u Tablici 28. te koze u Tablici 29.

Tablica 27. Rezultati cijepjenja goveda od 2015. do 2019. godine

	Σ stada goveda	Broj cijepjenih stada	% cijepjenih stada	Σ Broj goveda	Broj cijepjenih goveda	% cijepjenih goveda
2015.	32753	29852	91,14	470009	401201	85,36
2016.	31244	28068	89,83	462277	416310	90,06
2017.	29516	25687	87,03	467853	405068	86,58
2018.	31244	23112	73,97	462277	411291	88,97
2019.	29516	20393	69,09	467853	404795	86,52

Tablica 28. Rezultati cijepljenja ovaca od 2015. do 2019. godine

	Σ stada ovaca	Broj cijepljenih stada	% cijepljenih stada	Σ Broj ovaca	Broj cijepljenih ovaca	% cijepljenih ovaca
2015.	18921	15915	84,29	615717	511288	83,98
2016.	19249	16833	87,45	632087	525385	83,12
2017.	19500	17324	88,84	648818	552639	85,18
2018.	19067	16871	88,48	664037	540952	81,46
2019.	18680	16165	86,54	697216	539628	77,40

Tablica 29. Rezultati cijepljenja koza od 2015. do 2018. godine

	Σ stada koza	Broj cijepljenih stada	% cijepljenih stada	Σ Broj koza	Broj cijepljenih koza	% cijepljenih koza
2015.	5248	3728	71,04	73835	54776	74,19
2016.	5425	3990	73,55	75527	55126	72,99
2017.	5443	4153	76,30	78759	59849	75,99
2018.	5064	3896	76,94	81550	57845	70,93

Postotak cijepljenih životinja ukupno i na razini vrste nije značajnije varirao između županija na području regija sjevernog hrvatskog primorja, središnje i istočne Hrvatske, dok su značajne razlike uočene u odnosu na županije na području gorske Hrvatske i južnog hrvatskog primorja. Rezultati cijepljenja po godini i vrsti životinje, na razini županije prikazani su za goveda u Tablici 30., ovce u Tablici 31. i koze u Tablici 32.

Tablica 30. Rezultati cijepljenja goveda od 2015. do 2019. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.)

Županija	GOVEDA									
	2015.		2016.		2017.		2018.		2019.	
	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.
Bjelovarsko-bilogorska	90,92	88,80	89,38	90,08	84,97	84,00	73,63	84,94	68,56	80,72
Brodsko-posavska	94,91	86,37	92,93	92,18	90,18	86,13	76,09	90,70	74,50	93,24
Dubrovačko-neretvanska	56,44	47,07	40,67	49,11	66,50	56,35	50,72	56,44	35,53	49,17
Grad Zagreb	90,42	81,18	87,47	105,51	84,60	78,70	66,39	79,54	57,14	73,77
Istarska	94,41	90,83	94,07	88,50	91,84	90,00	85,18	86,21	86,41	83,54
Karlovačka	92,31	83,11	91,02	82,74	89,15	84,93	77,27	76,21	72,30	76,32
Koprivničko-križevačka	92,29	84,78	90,23	96,39	86,55	86,70	75,39	86,43	71,31	83,49
Krapinsko-zagorska	105,01	92,94	106,83	100,60	105,77	100,92	79,20	87,22	75,39	81,95
Ličko-senjska	81,91	73,20	84,99	72,42	79,12	73,70	73,52	82,65	67,88	82,06
Međimurska	98,09	96,33	98,30	108,87	96,82	90,64	79,12	89,35	72,28	89,96
Osječko-baranjska	83,90	85,21	82,60	98,03	77,00	92,47	70,71	96,68	66,44	93,73
Požeško-slavonska	90,48	89,64	90,74	99,93	87,52	89,81	71,47	92,36	66,29	74,09
Primorsko-goranska	88,00	78,62	92,73	81,29	85,71	82,39	80,28	89,25	76,79	82,57
Sisačko-moslavačka	91,85	86,22	89,18	84,31	88,62	85,55	74,44	93,70	72,49	92,38
Splitsko-dalmatinska	82,74	57,67	78,44	59,19	83,18	54,64	67,24	61,27	57,67	46,85
Šibensko-kninska	76,53	66,53	81,21	75,14	82,48	71,74	73,87	86,42	64,96	83,04
Varaždinska	96,85	88,38	91,11	90,45	90,41	88,99	66,49	83,36	59,44	82,39
Virovitičko-podravska	80,82	76,13	78,34	79,49	68,21	88,33	57,35	82,02	51,10	95,53
Vukovarsko-srijemska	84,65	87,50	86,24	89,51	79,09	88,77	70,98	95,71	63,59	87,15
Zadarska	75,81	73,51	73,53	68,72	80,18	72,60	76,47	82,31	77,51	82,48
Zagrebačka	97,46	90,34	95,69	84,14	93,21	89,79	77,00	95,78	72,05	98,45
Ukupno RH	91,14	85,36	89,83	90,06	87,03	86,58	73,97	88,97	69,09	86,52

Tablica 31. Rezultati cijepljenja ovaca od 2015. do 2019. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.)

Županija	OVCE									
	2015.		2016.		2017.		2018.		2019.	
	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.
Bjelovarsko-bilogorska	88,26	91,22	92,02	93,01	93,08	92,91	92,62	93,81	92,16	89,03
Brodsko-posavska	89,08	96,37	95,45	94,23	94,62	84,21	96,67	57,41	93,60	32,02
Dubrovačko-neretvanska	58,18	56,77	57,23	57,45	68,24	73,06	54,97	48,37	40,74	27,69
Grad Zagreb	72,73	115,88	70,59	67,17	64,86	70,92	64,56	52,19	34,18	64,24
Istarska	83,85	81,33	88,26	82,31	91,27	92,38	91,58	93,35	90,28	88,93
Karlovačka	85,53	90,14	86,48	80,96	91,18	91,65	92,35	89,22	90,44	89,41
Koprivničko-križevačka	84,99	85,89	86,75	93,49	85,70	89,33	87,04	84,87	85,52	77,56
Krapinsko-zagorska	76,42	77,07	85,68	92,44	89,54	94,41	94,33	94,85	96,82	97,45
Ličko-senjska	79,56	73,76	82,80	79,19	81,62	80,60	84,44	83,51	79,51	81,31
Međimurska	58,70	84,43	66,13	64,75	80,33	94,00	88,14	89,45	83,87	85,53
Osječko-baranjska	91,84	94,49	95,50	91,65	96,20	95,12	94,97	94,94	94,25	91,19
Požeško-slavonska	87,08	92,13	90,63	95,24	94,98	94,87	95,12	93,73	96,39	90,55
Primorsko-goranska	87,79	82,34	83,68	79,44	82,95	78,27	74,88	73,24	64,94	77,31
Sisačko-moslavačka	88,77	93,10	92,44	91,45	95,49	95,07	96,93	97,97	97,41	93,97
Splitsko-dalmatinska	79,26	72,56	79,01	72,04	77,78	74,52	60,27	55,24	57,49	54,15
Šibensko-kninska	78,84	82,91	84,49	83,33	85,60	87,24	85,69	82,83	83,48	82,13
Varaždinska	81,22	87,25	81,64	85,51	86,78	82,41	87,98	91,51	83,08	90,38
Virovitičko-podravska	90,45	86,89	95,41	92,89	97,34	89,86	96,61	91,55	95,14	90,49
Vukovarsko-srijemska	81,77	88,48	92,19	91,38	91,13	95,60	94,03	95,50	93,73	92,26
Zadarska	76,97	76,68	81,86	77,22	83,24	78,84	82,94	76,64	84,26	75,38
Zagrebačka	84,29	83,98	86,09	70,34	88,15	69,17	91,72	57,89	83,47	53,02
UKUPNO RH	84,29	83,98	87,45	83,12	88,84	85,18	88,48	81,46	86,54	77,40

Tablica 32. Rezultati cijepljenja koza od 2015. do 2018. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.)

Županija	KOZE							
	2015.		2016.		2017.		2018.	
	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.	gosp.	živ.
Bjelovarsko-bilogorska	74,55	82,57	84,67	91,09	80,08	86,17	78,31	79,43
Brodsko-posavska	87,50	101,37	92,03	95,32	89,66	97,48	93,23	101,46
Dubrovačko-neretvanska	38,38	52,35	39,20	48,19	44,12	63,72	42,46	43,35
Grad Zagreb	82,69	77,52	79,03	71,88	71,01	77,87	64,29	48,11
Istarska	76,92	83,67	82,17	79,48	84,08	93,37	80,42	84,66
Karlovačka	73,02	83,66	76,73	74,15	79,82	77,52	82,94	78,45
Koprivničko-križevačka	85,31	84,17	78,62	87,71	77,30	88,84	84,62	86,34
Krapinsko-zagorska	80,88	85,17	77,03	92,75	76,05	74,17	85,53	92,51
Ličko-senjska	44,30	63,68	53,29	58,77	60,00	74,07	55,61	79,99
Međimurska	79,71	85,46	82,67	93,29	88,89	109,13	91,30	96,18
Osječko-baranjska	79,94	92,04	90,67	103,18	88,20	87,20	97,03	86,37
Požeško-slavonska	67,52	63,83	79,52	77,48	89,70	81,38	96,34	103,28
Primorsko-goranska	69,76	78,85	71,12	76,31	72,92	84,07	67,53	66,15
Sisačko-moslavačka	69,48	74,46	82,70	73,23	86,73	80,43	89,51	94,62
Splitsko-dalmatinska	64,92	66,44	56,10	57,75	62,36	59,58	53,28	49,33
Šibensko-kninska	69,44	68,21	77,84	73,60	76,84	73,75	78,09	73,26
Varaždinska	82,71	89,91	79,02	91,77	81,63	85,54	86,23	77,74
Virovitičko-podravska	82,05	77,66	82,84	78,17	84,77	78,10	97,59	83,61
Vukovarsko-srijemska	85,34	86,79	89,02	95,70	87,80	92,86	104,29	90,71
Zadarska	59,71	67,96	57,56	64,86	69,01	69,15	68,62	64,02
Zagrebačka	74,48	86,13	76,77	80,74	83,28	85,09	83,39	88,01
UKUPNO RH	71,04	74,19	73,55	72,99	76,30	75,99	76,94	70,93

Obzirom da koze nisu cijepljene svih pet godina za redom kao goveda i ovce, radi ustanovljavanja da li cijepljenje utječe na pad broja seropozitivnih životinja podatci o cijepljenjima su grupirani u dvije osnovne skupine. Prvu skupinu podataka činili su podatci o svim govedima, ovcama i kozama pretraženim imunoenzimnim testom te svim cijepljenim životinjama od 2015. do 2019. godine. Analizom su obuhvaćeni rezultati pretraživanja 16 452 životinje (sve pozitivne i sve negativno pretražene životinje), te podatci o cijepljenju ukupno 225 987 stada preživača i 4 936 153 životinja. U drugoj skupini podataka isključeni su podatci o broju pretraženih životinja te cijepljenih životinja i stada tijekom 2019. godine za sve vrste preživača. Analizom su obuhvaćeni podatci za razdoblje od 2015. do 2018. godine koji uključuju rezultate pretraživanja 13 921 životinja (sve pozitivne i sve negativno pretražene životinje), te podatke o cijepljenju ukupno 189 429 stada preživača i 3 991 730 životinja.

U svim analizama 2015. godina smatra se polaznom godinom obzirom da je to prva godina cijepljenja protiv BPJ. Analize su provedene tako da su podatci prvo obrađeni bez uključenog efekta godine te potom i na razini godine.

Logistička regresija s županijom kao stohastičkim efektom korištena je u analizi obje skupine podataka. Kako bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna povezanost između postotka cijepljenih životinja i stada sa seropozitivnim životinjama analizirani su podatci o broju cijepljenih životinja na razini individualne vrste preživača, broju cijepljenih stada individualne vrste preživača, broju preživača ukupno te broju stada preživača u odnosu na ukupan broj životinja pretraženih imunoenzimnim testom putem univarijabilne analize. Očekivani rezultat analize bio je da s porastom postotka cijepljenih životinja i stada vjerojatnost za otkrivanje seropozitivne sentinel životinje eksponencijalno opada. Obzirom da koze nisu bile cijepljene u 2019. godini, kako bi se utvrdio utjecaj godine na rezultate, načinjena je dodatna analiza podataka za razdoblje 2015. do 2018. godine, te analiza podataka za razdoblje 2015. do 2019. godine gdje je broj cijepljenih koza unesen kao 0 za svaku županiju, što je rezultiralo

posljedicama i na broj i postotak cijepljenih životinja i stada preživaca u toj godini. Modeli se referiraju kao univarijabilna logistička regresija, iako je sam model uključivao varijablu od primarnog interesa, zajedno s godinom, te sam po sebi predstavlja multivarijabilni model. Međutim, smatrano je kako je efekt cijepljenja relevantno uzeti u razmatranje nakon što se uzme u obzir duljina trajanja programa, što je učinjeno na način da se godina uključi u analizu kao kategorijski fiksni efekt.

Rezultati univarijabilne analize dostupni su za godinu programa (Tablica 33.), te za ostale varijable s uključenom godinom kao fiksnim efektom (Tablica 34.). Općenito, kako je postotak cijepljenja u županiji rastao, tako se su izgledi za otkrivanje seropozitivnih sentinel životinja smanjivali. Takva vrsta povezanosti je utvrđena kao statistički značajna za sve varijable, osim za postotak cijepljenih ovaca i postotak cijepljenih stada ovaca, što je bio neočekivani nalaz (Tablica 34.).

Tablica 33. Univarijabilna analiza učinka cijepljenja na razini godine za razdoblje 2015. do 2019. u odnosu na ishod seropozitivnosti s uključenom županijom kao stohastičkim elementom

Godina	Koeficijent	Omjer izgleda (OR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)		Omjer izgleda (OR)	
				niži	viši	niži	viši
2015.	bazna godina	-	-	-	-	-	-
2016.	-0,465	0,628	<0,001	-0,579	-0,352	0,560	1,751
2017.	-0,45	0,637	<0,001	-0,583	-0,317	0,558	1,748
2018.	-0,877	0,416	<0,001	-1,021	-0,733	0,360	1,434
2019.	-1,014	0,362	<0,001	-1,17	-0,857	0,310	1,364

Tablica 34. Rezultati analize postotka cijepljenih životinja i stada u odnosu na ishod seropozitivnosti s uključenom županijom i godinom

Varijabla	Koeficijent	Omjer izgleda (OR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)		95% nterval pouzdanosti na Omjer izgleda (OR)	
				niži	viši	niži	viši
govedo	-0,017	0,983	< 0,001	-0,025	-0,008	0,975	2,652
koza	-0,019	0,981	< 0,001	-0,026	-0,012	0,974	2,649
ovca	-0,001	0,999	0,639	-0,007	0,004	0,993	2,699
stada goveda	-0,027	0,973	< 0,001	-0,038	-0,017	0,963	2,619
stada ovaca	-0,0006	0,999	0,891	-0,01	0,009	0,990	2,691
stada koza	-0,0014	0,999	< 0,001	-0,022	-0,006	0,978	2,660
stada preživača	-0,021	0,979	< 0,001	-0,032	-0,009	0,969	2,634
preživači	-0,009	0,991	0,042	-0,018	-0,0003	0,982	2,670

Svi dobiveni podatci potom su grupirani u četiri osnovna modela koji su uključili stohastički efekt županije te godinu i kombinirali analize sa svim vrstama životinja i stada. Analize su napravljene zasebno za razdoblje 2015. do 2019. godine te 2015. do 2018. godine.

U oba analizirana razdoblja u modelu u kojem su uključene ovce, koze i goveda, ovce niti na razini cijepjenih životinja, ni na razini cijepjenih stada nisu bile statistički značajne.

Procjena koliko dobro model odgovara podacima koje treba opisati te u konačnici i odabir najboljeg modela određen je primjenom Akaikeovog i Bayesovog informacijskog kriterija. U oba analizirana razdoblja kao najbolji model pokazao se onaj koji uključuje goveda i koze (Tablica 35. i 34.).

Tablica 35. Rezultati analize postotka cijepjenih životinja u odnosu na seropozitivnost tijekom razdoblja 2015.-2019. godine za goveda i koze načinjeni multivarijabilnom logističkom regresijom

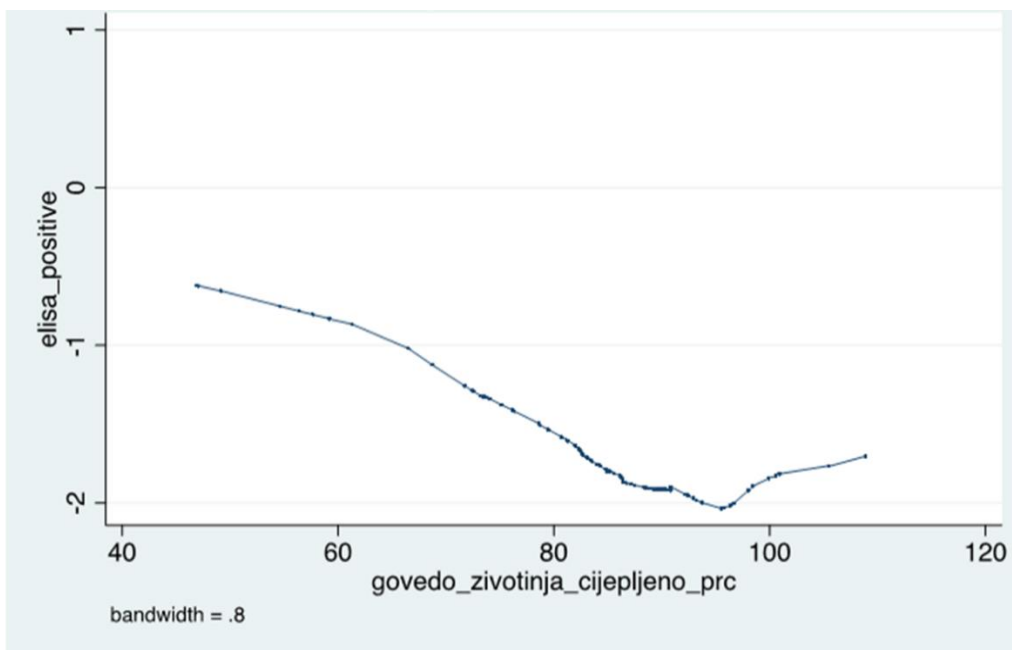
ELISA pozitivno	Koefficient	Omjer izgleda (OR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)		Omjer izgleda (OR)	
				niži	viši	niži	viši
2015.	polazna godina	-	-	-	-	-	-
2016.	-0,426	0,653	< 0,001	-0,544	-0,307	0,580	0,736
2017.	-0,405	0,667	< 0,001	-0,539	-0,271	0,583	0,763
2018.	0,811	2,250	< 0,001	-0,962	-0,66	0,382	0,517
2019.*	-2,388	0,092	< 0,001	-2,956	-1,821	0,052	0,162
govedo	-0,012	0,988	0,005	-0,021	-0,003	0,979	0,997
koza	-0,017	0,983	< 0,001	-0,024	-0,01	0,976	0,990

* U 2019. godini, postotak cijepjenih koza je naveden kao 0 za svaku županiju.

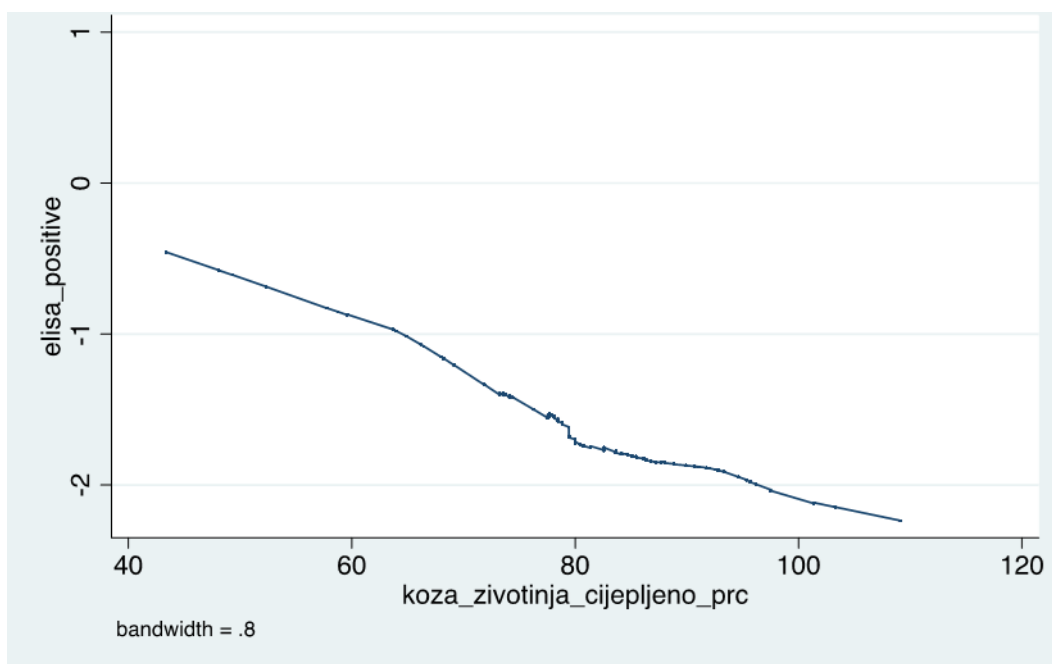
Tablica 36. Rezultati analize postotka cijepljenih životinja u odnosu na seropozitivnost tijekom razdoblja 2015.-2018. godine za goveda i koze načinjeni multivarijabilnom logističkom regresijom

ELISA pozitivno	Koeficijent	Omjer izgleda (OR)	p	95% Interval pouzdanosti (CI)		Omjer izgleda (OR)	
				niži	viši	niži	viši
2015.	polazna godina						
2016.	-0,366	0,694	< 0,001	-0,488	-0,245	0,614	0,783
2017.	-0,368	0,692	< 0,001	-0,502	-0,233	0,605	0,792
2018.	-0,73	0,482	< 0,001	-0,883	-0,576	0,414	0,562
2019.	0	0	0	-0	0	0	0
govedo	-0,024	0,976	< 0,001	-0,034	-0,014	0,967	0,986
koza	-0,011	0,989	0,004	-0,019	-0,003	0,981	0,997

Rezultati provedenih analiza potvrdili su da postoji statistički značajna povezanost između postotka cijepljenih životinja i stada sa seropozitivnim životinjama u goveda (Slika 69.) i koza (Slika 70.), odnosno da s porastom postotka cijepljenih životinja i stada vjerojatnost za otkrivanje seropozitivne sentinel životinje eksponencijalno opada.

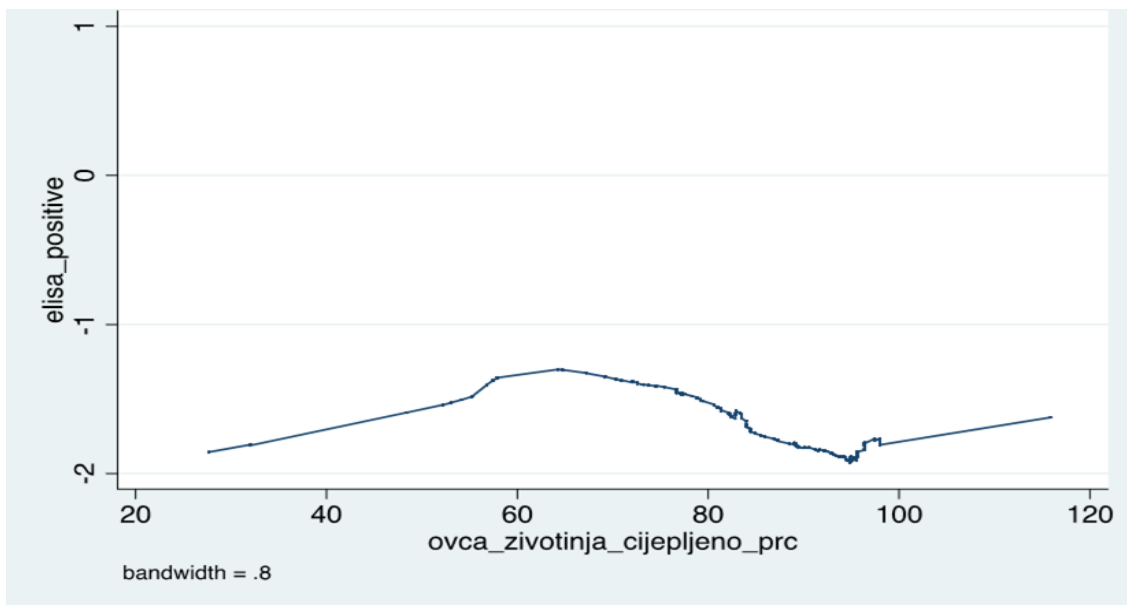


Slika 69. Grafički prikaz učinka cijepljenja goveda u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija)



Slika 70. Grafički prikaz učinka cijepljenja koza u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija)

Isto međutim nije utvrđeno za ovce (Slika 71.), a kao mogući razlozi nameću su greške u tehničkim podacima (greška u denominatoru koji se odnosi na brojno stanje životinja u nekim županijama utjecala je na nerazmjer u rezultatima cijepljenja), način držanja goveda i ovaca na području županija smještenih u sjevernom i južnom dijelu zemlje, neadekvatno ažuriranje podataka o brojnom stanju životinja u JRDŽ, mogući utjecaj maternalnih protutijela na rezultat serološkog pretraživanja te unos netočnih podataka o stvarno cijepljenim životinjama kao slučajna ili namjerna ljudska pogreška.

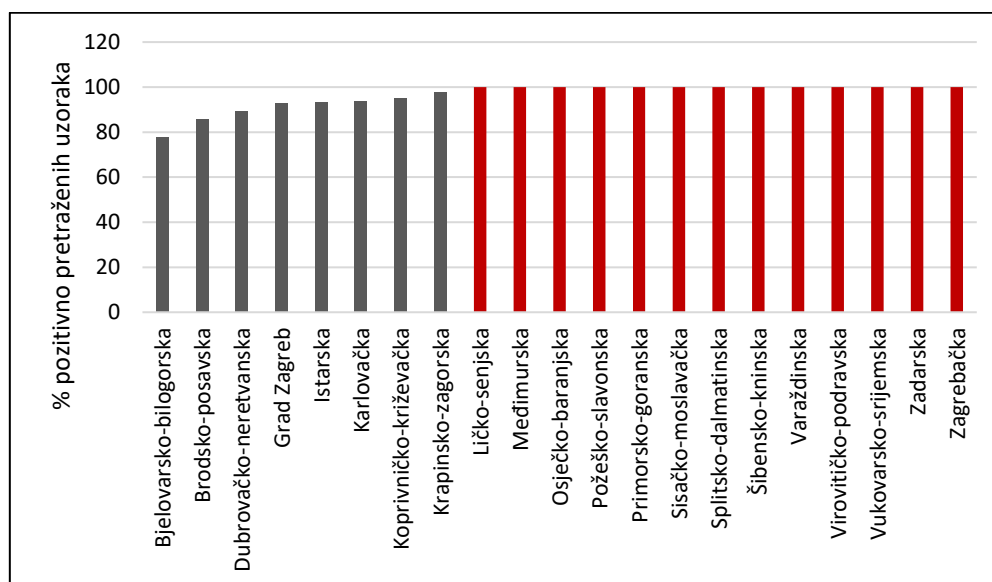


Slika 71. Grafički prikaz učinka cijepljenja ovaca u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija)

Usporedbom rezultata cijepljenja te stvarne prevalencije zaraženih stada preživača uočeno je da cijepljenje dovodi do smanjenja prevalencije (s 15,53% u 2016. godini na 0,52% u 2017. godini te niti jedan potvrđeni slučaj BPJ u 2018. i 2019. godini) kao i da opada postotak seropozitivnih stada, ali bez potpune eliminacije infekcije što potvrđuje dokazana seroprevalencija u sentinel životinja tijekom svih pet godina provedbe cijepljenja na području cijele zemlje.

Kontrola cjepnog imuniteta populacije preživača provedena je samo u polaznoj 2015. godini cijepjenja te su stoga dobiveni rezultati ocjenjeni kao nedostatni za daljnje analize učinka cijepjenja i prikazani su samo deskriptivno.

U kontrolu imuniteta uključena su bila ukupno 53 stada preživača te 707 životinja iz 21 županije, a uzorkovanje je provedeno četiri mjeseca nakon cijepjenja životinja drugom dozom cjepiva, odnosno nakon razdoblja stjecanja imuniteta sukladno uputi proizvođača cjepiva.. Pretražena su ukupno 632 uzorka, a protutijela kao posljedica cijepjenja utvrđena su u 95,88 % pretraženih uzoraka (606/632), dok je 4,11% (26/632) uzorka pretraženo s negativnim rezultatom (Slika 72.).



Slika 72. Prikaz postotka pozitivno pretraženih uzoraka kontrole cjepnog imuniteta na razini županije tijekom 2015. godine.

5.4.3. Entomološko istraživanje

Uzorci komarčića prikupljeni su lampama hvataljkama koje su bile smještene na području svih 21 županije. Lokacije lampi mijenjale su se tijekom godina unutar jedne županije na način da su postavljane u druga naselja i na druga gospodarstva, a uvijek su bile smještene na gospodarstvima na kojima su se obavezno nalazila goveda. Lokacije lampi hvataljki nisu

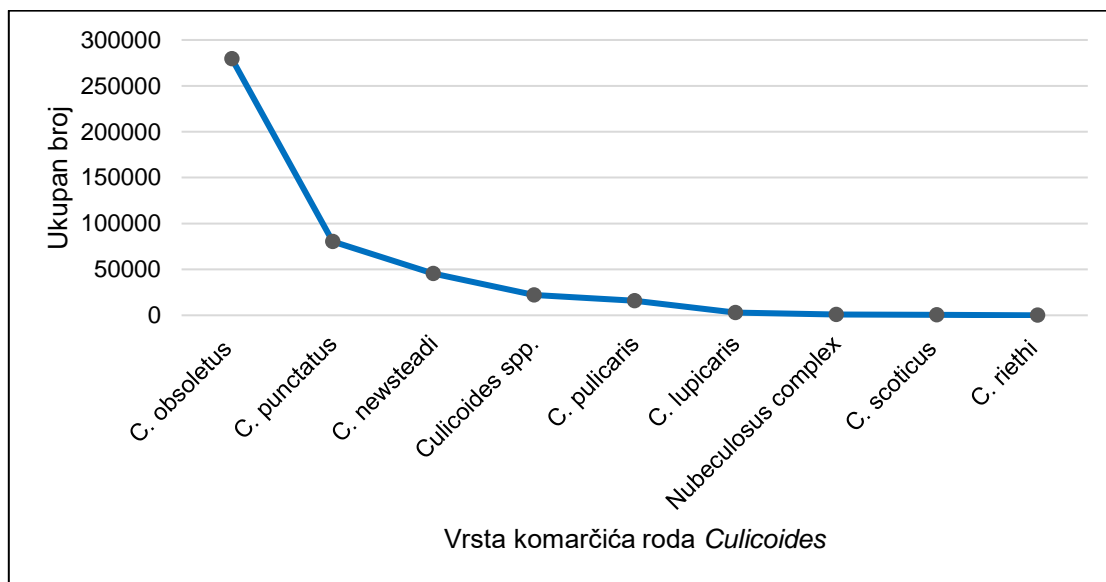
određivane prema lokacijama gospodarstava s sentinel životinjama te ne postoji njihova izravna povezanost. Iz prikupljenih uzoraka utvrđeno je razdoblje prikupljanja komarčića, određen je ukupan broj prisutnih odraslih komarčića roda *Culicoides*, utvrđena mjesečna dinamika pojavljivanja, identificirane su vrste vektora BPJ, određen njihov spol i puliranjem skupnih uzoraka vektora molekularnim pretraživanjem utvrđena cirkulacija virusa (Tablica 37.).

Tablica 37. Rezultati provedbe programa entomološkog nadziranja u razdoblju od 2015. do 2019. godine

Varijabla	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.
razdoblje provedbe	travanj - prosinac	svibanj - prosinac	ožujak - prosinac	veljača - prosinac	veljača - prosinac
ukupan broj dostavljenih uzoraka	127	159	200	203	379
ukupan broj prikupljenih <i>Culicoides spp</i>	49 310	49 386	47 579	165 123	115 955
najveći broj <i>Culicoides spp</i> (mjesec)	svibanj	lipanj	svibanj	lipanj	lipanj
najmanji broj <i>Culicoides spp</i> (mjesec)	prosinac	prosinac	studeni	veljača	veljača
dominantna vrsta (%)	<i>C. obsoletus</i> (43,08)	<i>C. obsoletus</i> (66,08)	<i>C. obsoletus</i> (77,62)	<i>C. obsoletus</i> (51,51)	<i>C. obsoletus</i> (49,39)
ženke (%)	97,26	72,19	77,25	99,69	99,67
mužjaci (%)	2,74	27,81	22,75	0,31	0,33
<i>C. imicola</i>			Nije utvrđen u RH		
RT- PCR	negativan	pozitivan	negativan	negativan	negativan

Dominantna vrsta na području cijele Hrvatske je *C. obsoletus* (30,25%), potom slijedi *C. punctatus* (14,61%) i *C. newsteadi* (10%), dok za 5,36% svih izdvojenih komarčića nije bilo moguće prema morfološkim karakteristikama niti molekularnim tehnikama odrediti vrstu te su svrstani u skupinu *Culicoides spp.*. Ostale identificirane vrste *C. lupicaris*, *Nubeculosus complex*, *C. scoticus* i *C. riethi* izdvojene su u manje od 1% uzoraka (Slika 73.). Do sada u

prikupljenim i obrađenim uzorcima komarčića *Culicoides spp.* nije utvrđeno prisustvo *C. imicola*. U svim prikupljenim uzorcima tijekom svih godina u značajnom postotku dominiraju ženke naspram mužjaka.



Slika 73. Vrste komarčića roda *Culicoides* utvrđene u Hrvatskoj od 2015. do 2019. godine

Najveći broj uzoraka prikupljenih iz lampi hvataljki dostavljen je 2019. godine (36% ukupnog broja uzoraka), a najmanji 2015. godine (12% ukupnog broja uzoraka). Dinamika dostave uzoraka po županijama na razini godine prikazana je u Tablici 38.

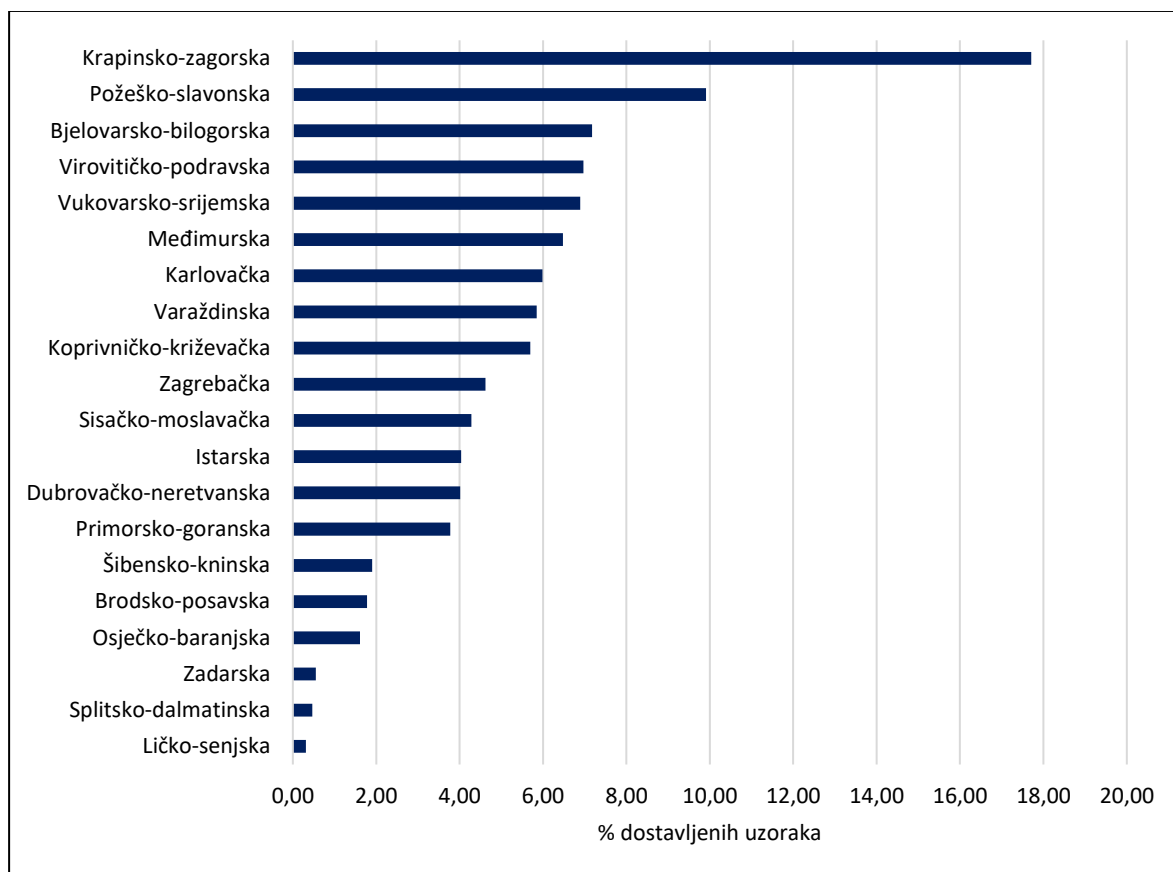
Tablica 38. Broj dostavljenih uzoraka prikupljenih iz lampi hvataljki od 2015. do 2019. godine na razini županije

Županija	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.
Bjelovarsko-bilogorska	10	6	10	9	18
Brodsko-posavska	3	8	10	11	20
Dubrovačko-neretvanska	7	8	10	11	4
Istarska	7	8	10	10	19
Karlovačka	5	8	10	11	21
Koprivničko-križevačka	6	8	10	11	21
Krapinsko-zagorska	8	8	10	10	20
Ličko-senjska	4	8	10	11	21
Međimurska	7	8	10	11	20
Osječko- baranjska	7	8	10	1	20
Požeško-slavonska	4	8	10	11	23
Primorsko-goranska	9	8	10	10	20
Sisačko-moslavačka	6	8	10	11	14
Šibensko-kninska	6	7	10	16	19
Varaždinska	8	8	10	11	20
Virovitičko-podravska	3	8	10	11	20
Vukovarsko-srijemska	7	8	10	9	20
Zadarska	6	8	10	8	19
Zagrebačka	6	9	10	10	20
Ukupno	119	150	190	193	359

Ukupno je od 2015. do 2019. godine prikupljeno 427 353 komarčića roda *Culicoides*. Broj prikupljenih komarčića po županiji i godini prikazan je u Tablici 39., a kumulativni omjer po županiji na Slici 74. Također, uočeno je značajno povećanje prosječnog broja izdvojenih komarčića u 2018. i 2019. godini (srednja vrijednost 7026,69/županiji) u odnosu na razdoblje 2015. do 2018. godine (srednja vrijednost 2437,91/ županiji).

Tablica 39. Broj komarčića *Culicoides* prikupljenih po županiji od 2015. do 2019. godine

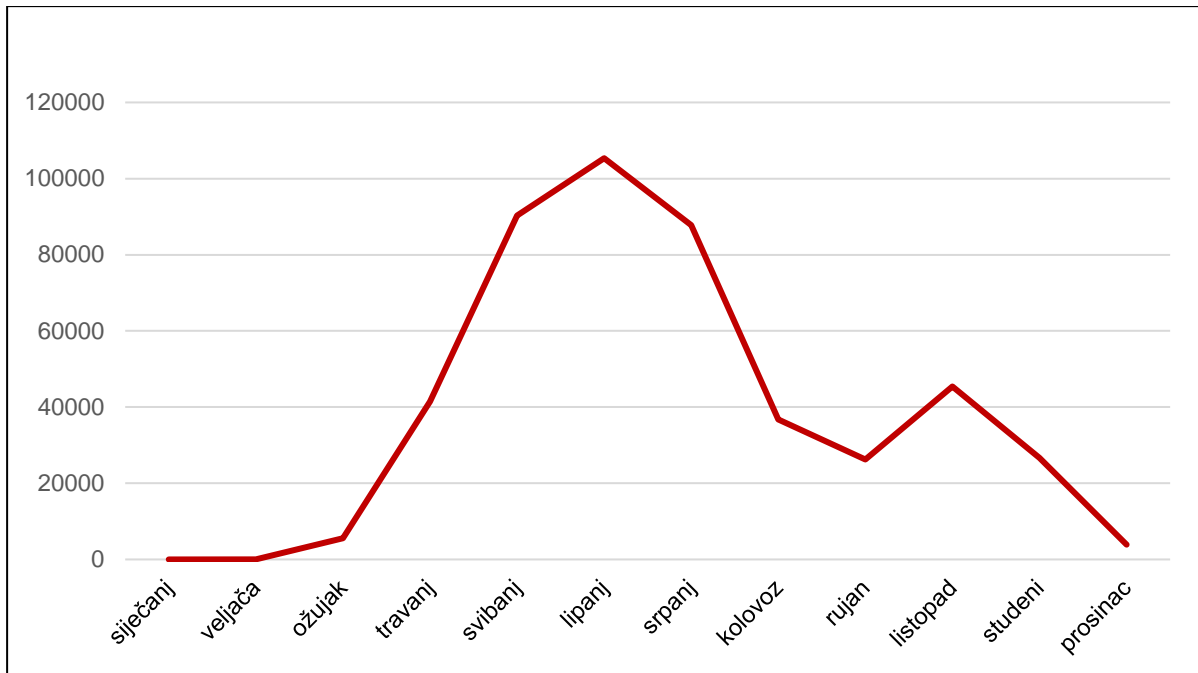
Županija	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.
Bjelovarsko-bilogorska	6292	4303	4417	8296	7986
Brodsko-posavska	494	1152	894	2345	3167
Dubrovačko-neretvanska	3916	3541	3345	9491	232
Istarska	2980	1431	516	9868	2491
Karlovačka	165	1147	5307	3587	15426
Koprivničko-križevačka	3147	7799	5871	9145	2243
Krapinsko-zagorska	8882	20526	11212	17381	22341
Ličko-senjska	36	423	198	638	433
Međimurska	96	130	420	22766	4284
Osječko-baranjska	2250	2329	727	539	2474
Požeško-slavonska	1290	4042	7862	14293	28988
Primorsko-goranska	41	1640	206	1593	58
Sisačko-moslavačka	12956	1679	1676	1516	1863
Splitsko-dalmatinska	317	44	138	0	14
Šibensko-kninska	87	394	2068	6884	869
Varaždinska	2364	12460	3807	15006	3615
Virovitičko-podravska	3	10122	176	9520	10941
Vukovarsko-srijemska	713	1646	230	22090	1849
Zadarska	437	154	32	70	227
Zagrebačka	2844	2015	263	10095	6454
UKUPNO	49 310	49 386	47 579	165 123	115 955



Slika 74. Grafički prikaz omjera ukupnog broja dostavljenih komarčića (%) po županiji od 2015. do 2019. godine

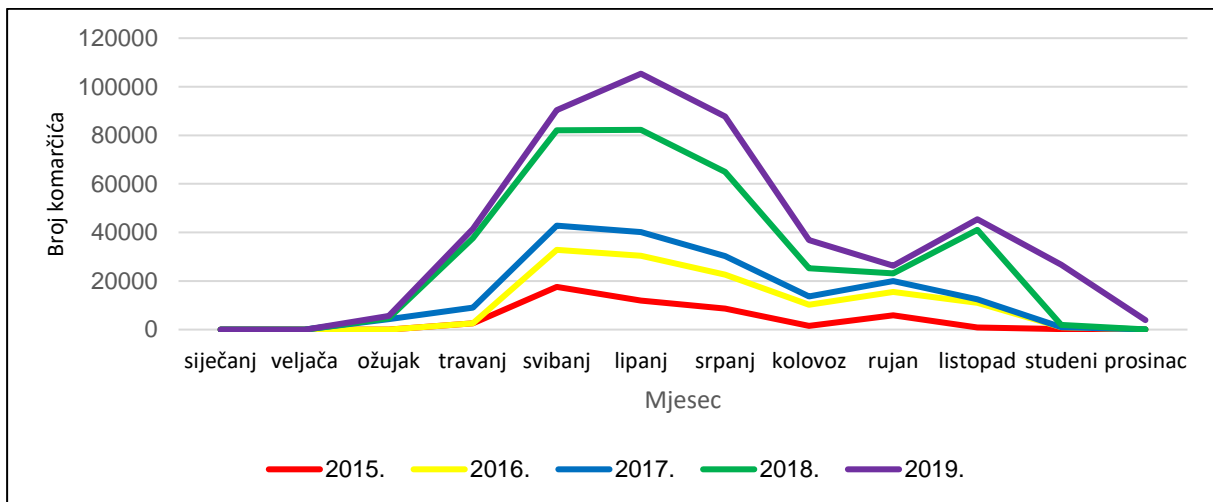
Entomološko nadziranje niti jedne godine nije obuhvatilo razdoblje svih dvanaest mjeseci, a kalendarski početak provedbe odnosno mjesec kada započinje uzorkovanje varira tijekom godina. Uočeno je i da propisana mjesečna dinamika uzorkovanja nije slijedila programom definirane kriterije, te je iz pojedinih županija dostavljen manji broj uzoraka od zadanog zbog čega podatci o mjesečnoj distribuciji i aktivnosti komarčića roda *Culicoides* nisu potpuni te ne daju cjelovitu informaciju o dinamici aktivnosti vektora niti na razini mjeseca niti na razini županije.

Ukupno promatrano tijekom pet godina provedbe entomološkog nadziranja najveći broj komarčića izdvojen je tijekom mjeseca lipnja, a najmanji u razdoblju veljače, ožujka, studenog i prosinaca. Niti jedan uzorak nije dostavljen tijekom mjeseca siječnja. (Slika 75.).



Slika 75. Grafički prikaz prosječne mjesečne vrijednosti broja komarčića *Culicoides spp* prikupljenih tijekom razdoblja od 2015. do 2019. godine

Bez obzira na dostavljeni broj uzoraka, isti rezultati dobiveni su analizom podataka na razini svake godine zasebno (Slika 76.).



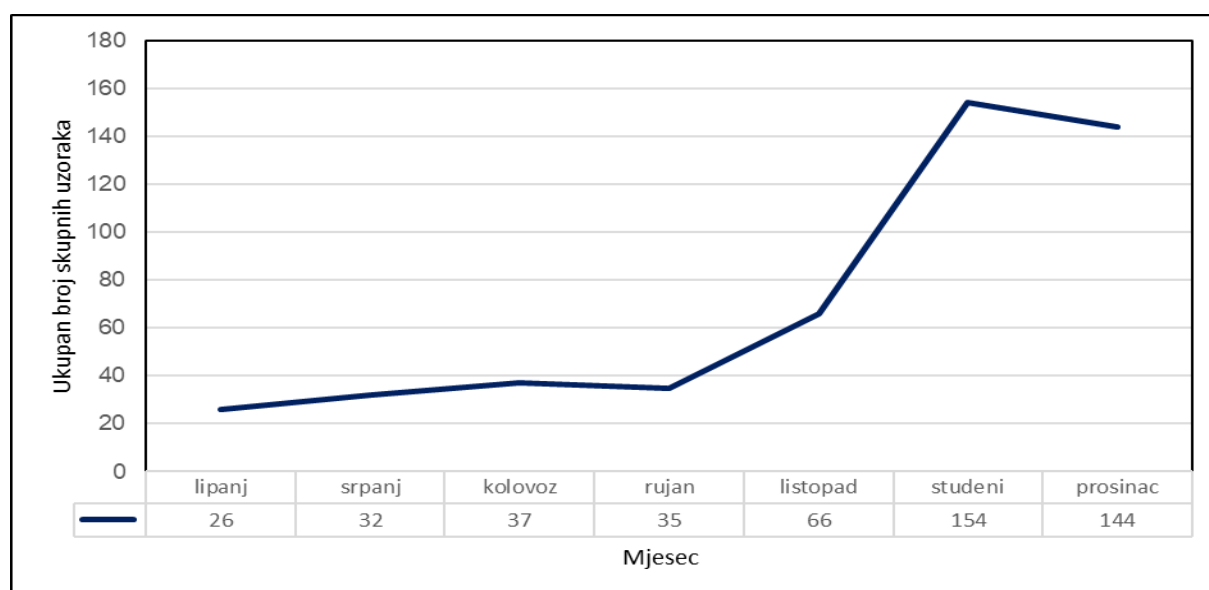
Slika 76. Mjesečna dinamika aktivnosti *Culicoides spp.* od 2015. do 2019. godine

Takav nalaz upućuje da bi razdoblje od studenog do prosinca te siječnja do ožujka vjerojatno odgovaralo razdoblju u kojem je aktivnost adulta izrazito smanjena ili je nema te bi se isto moglo smatrati razdobljem slobodnim od vektora.

Molekularno pretraživanje metodom RT-PCR provodilo se na skupnim uzorcima komarčića pri čemu su u uzorku bile uključene ženke i mužjaci adulta. Od 2015. do 2019. godine pretraženo je ukupno 593 skupnih uzorka komarčića (Tablica 40.). Prikupljeni i pretraženi uzorci potjecali su iz razdoblja lipanj - prosinac, dok niti jedan pretraženi uzorak nije niti prikupljen u razdoblju siječanj –travanj. Uzorci iz 2018, godine izuzeti su iz prikaza mjesečne dinamike pretraživanja skupnih uzoraka komarčića *Culicoides* (Slika 77.) jer za isto nisu dostupni podatci.

Tablica 40. Ukupan broj skupnih uzoraka komarčića roda *Culicoides* spp .pretraženih u razdoblju 2015. do 2019. godine

Godina	Ukupan broj skupnih uzoraka
2015.	135
2016.	145
2017.	112
2018.	99
2019.	102



Slika 77. Grafički prikaz mjesečne dinamike pretraživanja skupnih uzoraka komarčića *Culicoides* prikupljenih u relevantnom razdoblju od 2015. do 2019. godine

Virus BPJ metodom RT-PCR dokazan je u skupnim uzorcima komarčića samo jedan puta i to 2016. godine. Uzorci su potjecali s područja Dubrovačko-neretvanske županije te bili prikupljeni u prosincu na gospodarstvu na kojem je prethodno potvrđena BPJ. U četiri od ukupno 29 skupnih uzoraka dokazan je virus BPJ serotip 4, a vrste komarčića u kojih je virus dokazana pripadale su *C. obsoletus complexu* te vrsti *C. newsteadi*.

6. RASPRAVA

Slijedom izbijanja BPJ 2014. godine na području južnog hrvatskog primorja, 2015. godine uveden je niz mjera kojima se nastojalo spriječiti daljnje širenje BPJ po teritoriju RH te omogućiti nesmetani promet životinjama i njihovim proizvodima kao i pratiti cirkulaciju virusa BPJ na području RH, s posebnim osvrtom na moguće unošenje novih serotipova u rizična područja. Uz program nadziranja koji se provodio u doba godine kada se očekivala najveća vjerojatnost otkrivanja infekcije ili protutijela kao dokaza virusne aktivnosti te entomološko nadziranje na području svih županija, provodilo se i cijepljenje svih preživača protiv BPJ serotipa 4. Prve dvije godine strategija cijepljenja temeljena je na do tada uvrješanim postavkama da će mjera cijepljenja biti učinkovita ukoliko se provede na 80% prijemljive populacije. EFSA 2017. godine izrađuje procjenu utjecaja cijepljenja te trajanja kampanje cijepljenja na dinamiku BPJ, uvažavajući postotak procijepljenosti populacije te vremensko razdoblje cijepljenja (od jedne do pet godina). Primijenjeni matematički model simulirao je utjecaj cijepljenja na cirkulaciju virusa BPJ u četiri Europske zemlje smještene u području južne, zapadne i središnje Europe uzimajući u obzir čimbenike gustoće i strukture populacije preživača, temperature i osnovne vektorske vrste za svaku zemlju. EFSA u svojim zaključcima navodi da je jedina učinkovita mjera koja dovodi do iskorjenjivanja BPJ provedba kampanje masovnog cijepljenja u trajanju od najmanje 5 uzastopnih godina s 95% razinom procijepljenosti populacije, praćena programom nadziranja kojim se omogućava otkrivanje niske razine prevalencije virusa (manje od 1%). Uvažavajući preporuke EFSA, u RH je provedena masovna kampanja cijepljenja ukupne populacije preživača u trajanju od 5 godina (2015. – 2019.) kao i program nadziranja temeljen na odredbama važećeg zakonodavstva. Ipak, već u listopadu 2020. godine BPJ serotip 4 ponovno je potvrđen u RH na području Istarske županije, a do kraja 2020. godine izbijanje BPJ potvrđeno je u Istarskoj, Dubrovačko-neretvanskoj i Požeško-slavonskoj županiji. Vrlo slična situacija dobivena je tijekom simulacija

povedenih od EFSA-e i za druge europske države. Tako u državama središnje i zapadne Europe (Velika Britanija i Francuska) ponovna pojava BPJ javlja se u drugoj godini nakon prestanka cijepljenja, a u južnoj Europi (Italija i Španjolska) iako je prevalencija nakon cijepljenja smanjena, BPJ nije eliminirana niti nakon pet godina cijepljenja, te prestankom iste ubrzo dolazi do ponovne pojave bolesti (EFSA, 2017.). Temeljem navedenog EFSA zaključuje da pristup provedbi mjera ne može biti generaliziran, već je u planiranju neophodno uzeti u obzir i specifične uvjete (gustoću populacije, klimatske čimbenike) te strategiju temeljiti na pristupu „od slučaja do slučaja“.

Unatoč dugogodišnjoj provedbi programa nadziranja BPJ u RH koji traje od 2002. godine, objavljen je vrlo mali broj radova s podacima o seroprevalenciji i incidenciji BPJ u Hrvatskoj (LABROVIĆ i sur., 2002.; LISTEŠ i sur., 2004.; LISTEŠ i sur., 2011.; BOSNIĆ i sur., 2015.) te niti jedan vezan uz distribuciju i ekologiju vektora, klimatološke čimbenike povezane s ovom bolešću i učinak cijepljenja. Kako bi se bolje razumjela ograničenja u dosadašnjoj provedbi mjera nadziranja, kontrole i prevencije BPJ bilo je neophodno razjasniti način unosa serotipa 4 u RH, utvrditi mjere učestalosti, utvrditi magnitudo varijabilnosti seroprevalencije, analizirati čimbenike rizika značajne za ovu bolest te analizirati procijepljenost populacije.

Prvi potvrđeni slučaj BPJ prijavljen je 27. listopada 2014. godine u Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Nakon toga nastavlja se širenje bolesti te do kraja prosinca 2014. godine BPJ zahvaća područja prvo Šibensko-kninske, potom Splitsko-dalmatinske i Zadarske županije. Do ožujka 2015. godine BPJ potvrđena je u ukupno 64 stada na području svih županija regije južnog hrvatskog primorja. Kretanje bolesti tijekom kliničke faze epizootije odvijalo se u smjeru sjever- sjevero zapad, bez daljnje tendencije širenja van granica Zadarske županije. Uočeno je i da se BPJ od prvog prijavljenog slučaja 27. listopada do 10. studenoga proširila na udaljenost od oko 176 km zračne linije u smjeru sjevera, te je u istim granicama ostala sve do kraja kliničke faze epizootije. Usporedo s epizootijom u Hrvatskoj, BPJ serotip 4 je početkom listopada

prijavljena na području Crne Gore, na lokaciji udaljenoj svega 35 km zračne linije od mjesta prvog prijavljenog slučaja u Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Trend širenja BPJ u to vrijeme slijedio je smjer kretanja od Turske, preko Grčke, Bugarske, Makedonije, Srbije i Crne Gore do Hrvatske (ANONYMOUS, 2021.). Sukladno navedenom, ali i činjenici utvrđenoj tijekom ovog istraživanja koja ukazuje da je promet životinja iz i u Dubrovačko-neretvansku županiju bio zanemariv, možemo pretpostaviti da unos i širenje BPJ u RH nisu rezultat uvoza i premještanja zaraženih životinja već je isto vjerojatno vezano uz unos zaraženih vektora.

Ruže vjetrova kojima su prikazane relativne čestine i srednja brzina za pojedini smjer vjetra izrađene su za mjerne postaje Lastovo i Dubrovnik te su uspoređivani rezultati iz razdoblja 2009.-2013. godine u odnosu na 2014. godinu. Tijekom 2014. godine na mjernoj postaji Dubrovnik uočen je značajan porast relativne čestine i srednje brzine za vjetrove koji su puhali iz jugo istočnog međusmjera (smjer istok- sjevero istok, jugo istok), a na području mjerne postaje Lastovo za vjetrove koji su puhali iz smjera jugo zapadnog međusmjera (smjer jug – jugo zapad). Uspoređujući isto s podacima o izbijanju BPJ, uočeno je preklapanje pojave bolesti s ružom vjetrova u 2014. godini te izbijanjima BPJ serotipa 4 na području Dubrovačko-neretvanske županije, odnosno serotipa 1 na Lastovu. S obzirom na ranije dokazanu cirkulaciju serotipa 4 na području Makedonije, Srbije, Albanije i Crne Gore te serotipa 1 na obalnom području Italije (obala Jadranskog mora), te zanemariv broj premještanja životinja iz i na područje Dubrovačko-neretvanske županije, takav nalaz upućuje na činjenicu da se primarni unos virusa BPJ u RH odvijao pasivnim transportom zaraženih komarčića vjetrom. Isti primaran put unosa BPJ u nova područja i ranije je utvrđen u brojnim znanstvenim studijama (CALISTRI i sur., 2004.; DUCHEYNE i sur., 2007.; LISTEŠ i sur., 2009.; SZMARAGD i sur., 2010.; BURGİN i sur., 2013.; EFSA, 2017.). Genotipizacija virusa BPJ izdvojenih tijekom kliničke i aktivne faze kontrole epizootije BPJ omogućila bi potvrđivanje njihovog podrijetla no ista nije provedena.

Daljnje širenje bolesti bilo je u svezi s izrazito povoljnim klimatskim čimbenicima (kao što su smjer kretanja vjetera i temperatura). Slična dinamika širenja BPJ utvrđena je i epidemiološkom analizom epizootije BPJ serotipa 8 tijekom 2006. godine na području sjevero-zapadne Europe (EFSA, 2007.) te 2014. godine u Grčkoj tijekom epizootije serotipa 4 (MALESIOS i sur., 2020.).

Prva prijava sumnje na BPJ u RH rezultat je prijave oboljenja životinja od strane posjednika veterinaru. Obzirom da na području Dubrovačko-neretvanske županije postoji prethodna povijest kliničke pojave BPJ, svijest veterinara da na temelju blage kliničke slike postavi sumnju na ovu bolest bila je od ključnog značaja za rano poduzimanje daljnjih mjera kontrole BPJ. Epizootije u području sjeverne i središnje Europe ukazale su na smanjenu svijest posjednika i veterinara o BPJ uzrokovanu činjenicom da je bolest dominantno vezana uz klimatološki toplija (južna) područja Europe (ELBERS i sur., 2008.; MÉROC i sur., 2008.; NUSINOVICI i sur., 2014.). Uzimajući u obzir sve dosadašnje spoznaje o BPJ i čimbenicima koji utječu na njezino širenje u područja u kojima se ista ranije nije javljala, a u svrhu pravovremenog poduzimanja mjera sprječavanja širenja bolesti, te smanjenja ekonomskih posljedica na sektor poljoprivrede, neophodno je kontinuirano obnavljati znanja i podizati svijest kako veterinara tako i posjednika ne samo o BPJ nego i drugim vektorskim bolestima i njihovu ranu prepoznavanju (KROSCHEWSKI i sur., 2006.; JEBARA i sur., 2012.). U tu svrhu najbolje će poslužiti naša analiza kliničkih znakova zabilježenih tijekom 2014. i 2015. godine. Karakteristične kliničke znakove BPJ u RH ispoljavale su samo ovce, dok su u goveda i koza uglavnom prijavljeni nespecifični znakovi bolesti. Takav se nalaz podudara sa do sada utvrđenim spoznajama o kliničkoj slici BPJ koja se najčešće očituje u ovaca, dok je infekcija goveda i koza uglavnom asimptomatska (ERASMUS, 1975.; MACLACHLAN, 1994; COETZEE i sur., 2012.; ROJAS i sur., 2019.). Najčešće utvrđen klinički znak u svih vrsta životinja bio je iscjedak iz nosa, a u goveda i jedini. Patognomonični znakovi poput edema i

cijanoze jezika prijavljeni su u svega šest životinja. Ukupan zabilježeni pobol svih vrsta preživača u RH iznosio 19,33%, a pomor 3,31% za cijelo razdoblje kliničke faze epizootije. Pomor u goveda i koza bio je značajno niži od onog u ovaca i iznosio je 0,52% pri čemu za niti jedno uginuće nije objektivnim dijagnostičkim postupcima dokazano da je nastalo kao posljedica oboljenja životinje od BPJ. Uginuća životinja pripisivana su BPJ temeljem prijave veterinara kada je na gospodarstvu ista bila ranije potvrđena. Istovjetan blagi, nespecifičan klinički oblik bolesti praćen niskim pobolom i pomorom zabilježen je i tijekom epizootije BPJ serotipa 4 na području Španjolske 2012. godine (DIEGO i sur., 2014.) i Grčke 2014. godine (KATSOULOS i sur., 2016.; VASILEIOU i sur., 2016.). Istovremeno, u Albaniji se kao posljedica cirkulacije BPJ serotipa 4 uz oboljenje ovaca bilježe i značajnija oboljenja goveda, posebice mliječnih pasmina, uz pomor od 7,14%. Iako je takav pomor u goveda izrazito visok, autori navode da rezultati ne odstupaju od do sada utvrđenih spoznaja o ovoj bolesti (KOLECI i sur., 2017.). Srbija također bilježi izrazito visok pomor koji je u goveda, ovaca i koza iznosio 18,45%, 48,10% odnosno 54,17% (ĐURIĆ i sur., 2016.). Tako visoka smrtnost u goveda i koza nije u korelaciji sa uvriježenim spoznajama o kliničkom tijeku BPJ u tih vrsta životinja (BARRATT-BOYES i sur., 1995., DIEGO i sur. 2014).

Kako se preživači na području zahvaćenih županija RH u najvećem postotku drže ekstenzivno te u slučaju ovaca pripadaju većinom autohtonoj pasmini ovaca (dalmatinska pramenka), nametnulo se pitanje da li je na blagi tijek bolesti utjecaj imala činjenica da su možda ekstenzivne pasmine ovaca u određenoj mjeri otpornije na infekciju te obolijevaju blagim kliničkim oblikom bolesti. Takva otpornost autohtonih pasmina ovaca na infekciju BPJ zabilježena je i ranije na afričkom kontinentu te u istraživanjima BPJ s područja Grčke i Indije (THEILER, 1906.; PRASAD i sur., 2009.; KATSOULOS i sur., 2016.; RAO i sur., 2017.). Uz to postoji i vjerojatnost da je virus možda izgubio na infektivnosti višestrukom replikacijom kroz životinje tijekom epizootije u susjednim zemljama u kojima se nedvojbeno BPJ pojavila

neposredno prije nego u RH. Slično ponašanje virusa BPJ utvrđeno je u epidemiji serotipa 8 u Francuskoj kada su tijekom prve epizootije 2006. godine zabilježena značajna klinička oboljenja goveda (DARPEL i sur., 2007; MACLACHLAN i sur., 2009.), dok je za ponovnog izbijanja BPJ istog serotipa 2015. godine zabilježen značajno manji broj klinički oboljelih preživača (COURTEJOIE i sur., 2017). Smanjena virulentnost sojeva BPJ i ranije je opisana i objašnjena mogućom prilagodbom na vektore i lokalne domaćine te replikacijom virusa u različitim domaćinima (CAPORALE i sur., 2014.; SCHULZ i sur., 2017.).

Za razumijevanje dinamike kretanja te gustoće i distribucije populacije goveda, ovaca i koza u RH kao i povezanosti navedenih parametara s distribucijom seropozitivnih životinja te potvrđenim slučajevima BPJ bilo je potrebno prikupiti podatke o brojnom stanju životinja. Potrebni podatci na razini godine uključivali su varijablu županije, naselja, gospodarstva i broja individualnih životinja. Ovi podatci su u RH pohranjeni u bazi JRDŽ Ministarstva poljoprivrede. Prilikom selektiranja traženih podataka uočeni su određeni nedostaci koji se ne bi smjeli pojavljivati u sustavu. Podatci o ukupnom broju životinja na razini naselja tijekom iste godine nisu bili ujednačeni te je uočeno pojavljivanje više različitih podataka za varijablu za koju se očekivala ista vrijednost. Također, podatak ukupnog broja životinja u naselju nije odgovarao ukupnom zbroju individualnih životinja u istom naselju te je bilo potrebno provesti dodatne provjere i usklađivanje podataka. Isto je ukazalo na greške u sustavu koje je neophodno redovito pratiti i korigirati jer podatci o brojnom stanju životinja i gustoći populacije imaju izravan učinak na planiranje te odabir odgovarajućih mjera nadziranja, kontrole i prevencije bolesti kao i planiranje financijskih troškova potrebnih za implementaciju navedenih aktivnosti. Važnost podataka o brojnom stanju životinja i gustoći populacije istaknuli su Hartemink i sur. (2009.) prilikom razvoja modela za kartografsko mapiranje vrijednosti reprodukcijskog boja (R_0) vektorskih bolesti na primjeru BPJ. Nakon unosa bolesti u neko područje pomoću R_0 mogu se lako odrediti područja višeg rizika za daljnje širenje bolesti, no preduvjet za isto je

poznavanje relevantnih čimbenika koji izravno utječu na rizik izbijanja bolesti, a uključuju podatke o brojnom stanju životinja, klimatološke i entomološke čimbenike te geografske karakteristike područja (npr. značajke krajolika te način korištenja zemljišta). Također, važnost podataka o gustoći, odnosno brojnom stanju populacije kao neophodne varijable u modelima analize rizika koji se koriste kao alat za pripremu odgovarajućih strategija zdravlja životinja istaknuli su i Giovannini i sur. (2004.) preispitujući korake neophodne za izradu strategije kontrole bolesti plavog jezika u populacijama preživača na području Italije.

Kako bi se razjasnila povezanost između izloženosti riziku pojave BPJ te posljedica koje isto nosi, razdoblje kliničke faze epizootije i rana faza unosa BPJ analizirani su putem ustanovljavanja različitih mjera učestalosti uključujući računanje incidencije i prevalencije na razini stada i na razini individualne životinje. Tako je tjedna stopa incidencije za kliničku fazu epizootije izračunata za svaku individualnu vrstu preživača te za stada preživača koja su bila pozitivna metodom RT-PCR. Kumulativna incidencija (KI) stada iznosila je 68,97%, dok je na razini individualnih životinja ona iznosila 23,64%. Najviša incidencija BPJ na razini individualne vrste preživača utvrđena je u ovaca (16,04%), potom u koza (3,98%) i najniža u goveda (3,61%), a što odgovara nalazu i u drugim, geografski bliskim zemljama, Bugarskoj, Makedoniji i Grčkoj (ROBERTS i sur., 2014.).

Kliničku fazu obilježila su dva vrhunca epizootije, u 2014. godini tijekom 47. tjedna (17. – 23. studenog) i u 2015. godini tijekom 10. tjedna (02.- 08. ožujak). Izuzevši listopad 2014. kada je BPJ prvi puta potvrđena, najviša mjesečna kumulativna incidencija zabilježena je tijekom mjeseca studenog 2014. godine (KI stada = 83,33%, KI preživača = 43,08%), a tijekom 2015. godine u siječnju (KI stada = 57,14%, KI preživača = 31,25%). Tijekom prvih mjeseci epizootije u 2014. godini najveći broj pozitivnih životinja činile su ovce, dok je broj pozitivnih goveda i koza dominirao epizootijom u 2015. godini.

Ukupna prevalencija stada tijekom kliničke faze epizootije iznosila je 68,08%, a na razini životinje 23,66% što se podudara sa rezultatima iz drugih istraživanja, poglavito Italije tijekom izbijanja BPJ 2013.-2014. godine uzrokovane serotipom 1 (CARVELLI i sur., 2019.). Istovremeno, seroprevalencija stada pretraženih radi kliničke sumnje bila je 89,83%, a seroprevalencija unutar stada preživača 29,38%. Sve životinje pretražene radi kliničke sumnje bile su pozitivne metodom RT-PCR, dok u niti jedne životinje pretražene iz drugih razloga sumnje (bez kliničkih znakova) nije dokazano prisustvo virusa BPJ u krvi. Takvi ishodi laboratorijskog pretraživanja uočeni su i u Belgiji, Njemačkoj, Nizozemskoj i Francuskoj tijekom epizootije serotipa 8 u 2006. godini (EFSA, 2007.) te Italiji tijekom epizootije serotipa 1 u razdoblju 2013. – 2014. godine (CARVELLI i sur., 2019.).

U svrhu utvrđivanja relativne varijabilnosti te određivanja statistički značajne administrativne razine najpogodnije za usmjeravanje mjera, analizom varijance na tri hijerarhijske razine načinjena su četiri različita modela u kojima su bile uključene različite kombinacije triju administrativnih razina županije, naselja i stada te rezultat imunoenzimnog testa ovaca pretraženih radi kliničke sumnje. Pri tome je hijerarhijska logistička regresija s binarnim ishodom rezultata pretraživanja imunoenzimnim testom ovaca korištena kako bi se ustanovila relativna varijabilnost pozitivnog serološkog odgovora na razini županije, naselja i stada. Potonje administrativne jedinice koristile su se kao stohastički efekti u hijerarhijskoj logističkoj regresiji (DOHOO i sur., 2001., 2010.). Analiza varijance na tri hijerarhijske razine u svim modelima i kombinacijama dokazala je da je razina varijabilnosti najveća na razini županije te je usmjeravanje mjera kontrole i prevencije bolesti prema najvećoj hijerarhijskoj razini, odnosno županiji, i najučinkovitije. Uočeno je i da seropozitivnost stada nije jednoliko distribuirana po zahvaćenim županijama već je najveći broj seropozitivnih stada bio smješten u blizini prvog potvrđenog slučaja u nekom području te da se seroprevalencija stada smanjivala kako se bolest širila iz smjera Dubrovačko-neretvanske županije sjevernije na područja drugih

županija. Slično su utvrdili Méroc i sur. (2009.) za širenje BPJ serotipa 8 u Belgiji 2006. godine, zatim Hendrickx i sur. (2008.) kada su primijenjenim modelom dokazali da se 50% slučajeva BPJ događa unutar 5 km, a 95% slučajeva unutar 31 km od mjesta prethodnog izbijanja bolesti, te također Malesios i sur. (2020.) u prostornoj analizi širenja BPJ serotipa 4 u Grčkoj kojom je utvrđeno uglavnom lokalizirano širenje bolesti na udaljenosti ne većoj od 12 km između dva žarišta (HENDRICKX i sur. 2008.; MÉROC i sur., 2009; MALESIOS i sur., 2020.).

Prema utvrđenom serotipu izdvojena su dva klastera epizootije koja se međusobno nisu spojila, prvi (veći) uzorkovan virusom BPJ serotipa 4 karakteriziran distribucijom po cjelokupnom području Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske županije i drugi (manji) uzrokovan virusom BPJ serotipa 1, distribucijski ograničen samo na otok Lastovo. Neka od mogućih obrazloženja za takvu bimodalnu distribuciju serotipa povezana su sa meteorološkim prilikama, kao što je smjer kretanja vjetra zabilježen iz pravca Italije prema Lastovu, a koji je vjerojatno pogodovao širenju vektora vjetrom iz područja Italije u kojima je zabilježena cirkulacija BPJ serotipa 1. Druga vjerojatnost vezana je za moguće razdoblje unosa vektora tijekom klimatološki hladnijeg razdoblja godine te posljedično manjoj gustoći i nižoj aktivnosti njihove populacije tijekom zimskog razdoblja. Teoriju pasivnog transporta vektora vjetrom preko velikih vodenih površina kao što su Sredozemno ili Jadransko more potvrđuju i raniji prijenosi BPJ iz područja sjeverne Afrike u Italiju te iz Italije u Hrvatsku (CALISTRİ i sur., 2004.; LISTEŠ i sur., 2009.; BURGİN i sur., 2013.; EFSA, 2017.), a isto je dokazano razvojem modela atmosferske disperzije koji je, temeljem parametara neophodnih za simulaciju leta komarčića roda *Culicoides* i entomoloških podataka o aktivnosti vektora u Velikoj Britaniji, potvrdio širenje serotipa 8 iz središnje Europe u Veliku Britaniju (SZMARAGD i sur., 2010.).

Ranije je dokazano da su ekologija i dinamika vektora izravno vezane uz različite abiotičke i biotičke čimbenike, posebice temperaturu (COOK i sur., 1992.; ROGERS i sur., 2003.). Prema

klimatološkoj analizi DHMZ 2014. godine cijela površina Hrvatske okarakterizirana je kao ekstremno topla godina, te se smatra najtoplijom godinom od početka mjerenja. Uz to 70% površine Hrvatske klimatološki je okarakterizirano kao ekstremno kišno, 25% površine vrlo kišno i 5% površine kao kišno, pri čemu su ekstremno kišna razdoblja zabilježena tijekom veljače, travnja, svibnja, lipnja, srpnja, rujna i prosinca 2014. godine. Kako bi se utvrdio utjecaj abiotičkih faktora na unos i širenje BPJ u RH za glavne mjerne postaje Dubrovnik, Split, Šibenik i Zadar obrađene su numeričke vrijednosti temperature, vlage, brzine i smjera vjetra te oborina u razdoblju 01. lipanj 2014. do 01. srpanj 2015. godine. Na temelju izračuna kvantitativnih varijabli tjednih vrijednosti (prosjeaka ili suma) temperature, vlage, oborina i brzine vjetra opisanih metodama deskriptivne statistike na bazi vrijednosti percentila regresijskom analizom su utvrđeni čimbenici rizika za nove slučajeve BPJ u županiji tijekom kliničke faze epizootije. Svaka varijabla obrađena je zasebno univarijabilnom analizom, usporedbom kategorijskih i linearno kvantitativnih varijabli, te je utvrđivan statistički značaj istih u odnosu na rizik od pojave novih slučajeva BPJ u RH. Univarijabilnim analizama klimatoloških varijabli statistički značajna povezanost s brojem novih slučajeva u županiji utvrđena je samo za temperaturu, pa tako porast srednje dnevne temperature na 18° C povećava broj slučajeva u županiji za 4,18 puta, dok se sa nižim prosječnim tjednim temperaturnim minimumom očekivani broj slučajeva u županiji smanjuje se za 84% od bazne vrijednosti. Usporedba varijabli za srednju vrijednost vlage, oborine i brzinu vjetra nije pokazala statistički značajnu povezanost sa slučajevima BPJ. Obrada podataka za smjer kretanja vjetra prikazana je ružom vjetrova. Nadalje, varijabla za četverotjedni kumulativ slučajeva BPJ u županiji pokazala je statistički značajnu povezanost s slučajevima BPJ. Analiza pokazuje da kako u prethodna četiri tjedna (od tjedna interesa) raste broj slučajeva u županiji, tako se očekivani broj slučajeva u narednom razdoblju povećava za 1,69 puta. Statistički značajne varijable potom su uključene u završni multivarijabilni regresijski model te su zaključci bili identični

rezultatima univarijabilne analize, odnosno kako se u županiji povećava temperatura tako se broj očekivanih slučajeva povećava za 2,44 puta. Slična statistički značajna povezanost klimatoloških varijabli utvrđena je i u ranije provedenim znanstvenim analizama; tijekom epizootije serotipa 8 u središnjoj i zapadnoj Europi 2006. godine povezanost širenja BPJ uočena je za vrijednosti temperature (pad temperature usporava širenje, dok porast temperature pogoduje porastu broja slučajeva), vlaga i oborine nisu imale utjecaja na širenje BPJ. Također, učestalija izbijanja BPJ uočena su u područjima temperaturno toplijim od uobičajenog prosjeka (EFSA, 2007.; BOENDER i sur., 2014.). Virus BPJ ne može samostalno opstati u okolišu te prijenos istog uključuje interakcije između domaćina, virusa, vektora i okoliša, a nakon prijenosa preživljavanje virusa najviše ovisi o temperaturi (DE LIBERATO i sur., 2010.). Također uz abiotičke dokazan je utjecaj i biotičkih čimbenika, primarno onih vezanih uz okoliš (npr. vegetacije, geografske karakteristike područja, primjena agrotehničkih mjera obrade tla i drugo) (COOK i sur., 1992; DE LIBERATO i sur., 2010.), no isti nisu obrađeni tijekom ovog istraživanja.

Aktivnu fazu kontrole epizootije obilježila je provedba programa nadziranja dizajniranog na način da je na području geografske jedinice veličine 45 x 45km (područje županije) za uzorkovanje određen odgovarajući broj nasumično odabranih sentinel životinja, poštujući zakonski propisane postavke za određivanje veličine uzorka. Sentinel životinje primarno su bila goveda, a u slučaju da ih nije bilo kao zamjenski sentineli odabirane su primarno ovce te u manjoj mjeri koze. Sentineli su uzorkovani u propisanim intervalima s varijabilnom frekvencijom ovisno o ciljevima programa. Seroprevalencija BPJ u sentinel životinja pružila je značajne informacije o stupnju cirkulacije virusa u stadima preživača te razini zaštite od novih infekcija. Mjere učestalosti izračunate su na nekoliko razina. Na razini vrste, najviša ukupna seroprevalencija utvrđena je u goveda (10,62%), potom ovaca (5,64%) i zatim koza (0,13%) što je zapravo odgovaralo broju korištenih sentinela prema vrsti preživača. Kad promatramo

ukupnu prevalenciju na razini stada, najviša (15,53%) je utvrđena 2016. godine, a najniža 2017. godine (0,52%). S druge strane, najveći udio pozitivnih uzoraka u odnosu na ukupan broj utvrđen je 2015. godine (23% pozitivnih), nakon čega se bilježi kontinuirani pad i broja pretraženih i broja pozitivnih uzoraka. Tijekom cjelokupnog razdoblja faze aktivne kontrole epizootije najveći broj pozitivnih uzoraka utvrđen je tijekom listopada, s tendencijom pada u studenom i prosincu, dok od veljače do rujna nije zabilježen niti jedan pozitivan slučaj BPJ. Istu mjesečnu distribuciju karakterizira izbijanje BPJ u Italiji 2001. godine (GIOVANNINI i sur., 2004.). Unatoč činjenici da su seropozitivni sentineli otkrivani tijekom cijelog razdoblja, od 2018. godine nije bilo slučajeva BPJ potvrđenih molekularnim metodama. Uzimajući u obzir činjenicu da je 2015. godine započelo cijepljenje svih preživača protiv BPJ takav nalaz je očekivan jer korespondira s provedbom mjere.

Širenje BPJ primarno je vezano uz komarčiće roda *Culicoides* koji se smatraju jedinim biološkim vektorima BPJ (MEISWINKEL i sur., 2004.; SAVINI i sur., 2005.). Od svih klimatskih čimbenika temperatura najviše utječe na razvojni ciklus ovih vektora (MELOR i sur., 2000.; WITTMANN i BAYLIS, 2000.). U umjerenim klimatskim područjima, hladna zima ili izrazito vruće ljeto značajno utječu na smanjenje njihove populacije (PURSE i sur., 2005.). Program entomološkog nadziranja proveden je na području svih županija na način da su se uzorci prikupljali s jedne lokacije po županiji, no bez ujednačene mjesečne distribucije koja bi pokrila cjelogodišnji ciklus praćenja populacije vektora. Tijekom provedbe programa propisana dinamika dostave uzoraka nije poštivana pa su stoga i rezultati provedbe programa ograničeni u odnosu na mogućnosti tumačenja mjesečne distribucije vrsta vektora kao i geografsku proširenost te gustoću. Ono što se može zaključiti je da cirkulacija vektora u RH ima dva vrhunca, prvi (veći) tijekom svibnja-lipnja te drugi (manji) tijekom listopada. Manji broj vektora izdvojen je iz lampi hvataljki tijekom prosinca i razdoblja siječanj – ožujak. Takva mjesečna distribucija vektora podudara se s nalazima iz drugih zemalja primjerice Španjolske

i Italije (AGUILAR-VEGA i sur., 2020.). Kako nedostaju podatci o prisutnosti i brojnosti vektora za zimsko razdoblje, nije moguće raspravljati o određivanju razdoblja slobodnog od vektora već se samo pretpostavlja da bi se razdoblje od prosinca do ožujka moglo, zbog značajno smanjenje aktivnosti vektora, smatrati razdobljem slobodnim od vektora.

Do nedavno se *C. imicola* smatrao najznačajnijim vektorom BPJ, no širenja BPJ van uvriježenih klimatoloških granica na područja sjeverne Europe ukazala su na sve veći značaj drugih vrsta vektora posebice *C. obsoletus* i *C. pulicaris* kompleksa (BRUGGER i sur., 2013.; SAVINI i sur., 2014.). U RH nedvojbeno je utvrđeno dominantno prisustvo palearktičkih vrsta *Obsoletus* i *Pulicaris* kompleksa, posebice *C. obsoletus* (30,25%), *C. pulicaris* (16,61%) i *C. newsteadi* (10%) dok vrsta *C. imicola* nije utvrđena u niti jednom uzorku. Rezultati petogodišnje provedbe programa tako su ponovno potvrdili ranije nalaze entomoloških istraživanja u Hrvatskoj o odsutnosti *C. imicola* te izrazitoj dominaciji komarčića *Obsoletus* i *Pulicaris* kompleksa (LISTEŠ i sur., 2004.). Iako je virus BPJ, i ranije, na drugim područjima istog klimatskog pojasa (Cipar, Italija) izdvojen iz *C. obsoletus* (MELLOR i PITZOLIS, 1979.; DE LIBERATO i sur., 2005.; SAVINI i sur., 2005.) i *C. pulicaris* (CARACAPPA i sur., 2003.), postavlja se pitanje potpunog izostanka *C. imicola* na području južnog hrvatskog primorja, obzirom to geografsko područje karakteriziraju slični ili isti klimatološki uvjeti nekih drugih Europskih zemalja (npr. Italija, Grčka) u kojima je *C. imicola* dominantna vrsta. Utvrđeno je da je razina afiniteta prema hranjenju komarčića *Obsoletus* kompleksa manja nego u *C. imicola*, kao i da globalno zatopljenje posljedično utječe na povećanje brojnosti njihove populacije, a upravo povećana brojnost kompenzira nižu razinu afiniteta prema hranjenju (PURSE i sur., 2005.). Stoga njihova široka rasprostranjenost po središnjoj i sjevernoj Europi izazva dodatnu zabrinutost u odnosu na pomicanje granica pojavnosti BPJ i drugih vektorskih bolesti u budućnosti. Istraživanja *C. imicola* i *Obsoletus* kompleksa s područja Italije dala su dijametralno suprotne informacije u odnosu na utjecaj abiotičkih i biotičkih čimbenika na gustoću njihove populacije. Dok je *C.*

imicola uglavnom vezan uz područja u kojima postoje optimalni biotički i abiotički uvjeti za njegov razvoj, uočeno je da komarčići *Obsoletus* kompleksa imaju širu rasprostranjenost zbog većeg raspona tolerancije na temperaturu, nadmorsku visinu i opće geografske karakteristike područja u kojem obitavaju, odnosno ove dvije vrste komarčića ne dijele zajednička staništa (PERRIN i sur., 2006.). *C. imicola* je heliofil te obitava u muljevitim i sušim područjima bez pretjerane vegetacije (MEISWINKEL i sur., 2004.b), dok se staništa *Obsoletus* kompleksa nalaze u sjenovitim područjima bez izravnog dotoka sunčeve svjetlosti, kao što su močvarna područja, zaostale nakupine vode u trulom drveću, nagomilano staro lišće, nakupine starog stajskog gnoja, slama kontaminirana fekalijama i gljivicama koje propadaju te gdje prevladavaju uvjeti truljenja (CONTE i sur., 2007.; BLANDA i sur., 2018.). Uz ranije istaknuti abiotički čimbenik temperature, postojanje odgovarajućeg staništa za razmnožavanje te razvoj ličinke od ključnog je značaja za prevalenciju odraslih vektora (CONTE i sur., 2007.). Distribucija komarčića prema vrsti ujednačena je na području cijele RH, odnosno komarčići *Obsoletus* kompleksa dominiraju na cijelom području zemlje, a unutar *Pulicaris* kompleksa uočena je i visoka gustoća *C. newsteadi*. Prema dosadašnjim spoznajama upravo potonja vrsta predstavlja svojevrsnu poveznicu u prijenosu virusa između domaćih i divljih preživača (TALAVERA i sur., 2015.). Kako do sada nije rađena analiza utjecaja klimatoloških i ekoloških čimbenika na pojavnost i distribuciju različitih vrsta vektora niti je rađeno istraživanje pojave BPJ u divljih preživača, ostaju neodgovorena brojna pitanja vezana uz primjerice razumijevanje staništa vektora, dominantno prisustvo palearktičkih vrsta vektora u mediteranskoj biogeografskoj regiji RH, interakciju određenih vrsta vektora s domaćinima i njihovu povezanost s divljim preživačima, sezonalnu aktivnost te mehanizme prezimljavanja. Obzirom na ranije dokazanu vektorsku ulogu palearktičkih vrsta komarčića te trenutne klimatske promijene i mogućnost širenja drugih vektorskih zaraznih bolesti potrebno je temeljitije analizirati edafske, klimatološke i orografske čimbenike koji izravno ili neizravno

utječu na ekologiju vektora posebice njihovu sezonalnost, distribuciju i interakciju s domaćinima na području RH. Takva geo-statistička analiza prostorne distribucije komarčića roda *Culicoides* alat je kojim bi se učinkovitije analizirao rizik od pojave vektorskih zaraznih bolesti, omogućilo bi se ciljano usmjeravanje pravovremenih mjera kontrole u rizična područja kao i učinkovitije planiranje strategija kontrole ne samo BPJ nego i vektorskih zaraznih bolesti u RH općenito. Iako rezultati dostupnih studija ukazuju da divlji preživaci (poglavito jelen obični) vrlo vjerojatno imaju određenu ulogu u cirkulaciji virusa i održavanju infekcije BPJ u određenom području, i to posebice ako je gustoća kompetitivne vrste domaćih preživaca niska, njihova uloga u prezimljavanju virusa još uvijek nije potvrđena (RUIZ-FONS i sur., 2014.; EFSA, 2017.). Do sada u RH nije rađeno niti jedno istraživanje BPJ na divljim preživcima kako bi se utvrdila interakcija s utvrđenim vrstama komarčića roda *Culicoides* kao i njihova možebitna uloga u održavanju infekcije te prezimljavanju.

Uvažavajući epizootiološku situaciju u 2014. godini te naglo širenje BPJ ne samo na području RH nego i svih susjednih zemalja, početkom 2015. godine donesena je odluka o provedbi cijepljenja cjelokupne populacije domaćih preživaca u RH. Strategija cijepljenja temeljena je na pretpostavci da će odgovarajuća procijepljenost populacije preživaca smanjiti cirkulaciju virusa i njegovo širenje na druga područja te posljedično utjecati i na smanjenje ekonomskih gubitaka proizašlih iz restrikcija u premještanju životinja. Za razdoblje 2015. – 2019. godine prosječna kumulativna procijepljenost stada iznosila je 88,93%, a preživaca 84,55%. Na razini individualne vrste preživaca 96,73% goveda, 77,40% ovaca i 70,93% koza bilo je cijepljeno protiv BPJ na odgovarajući način. Osim različite razine procijepljenosti individualne vrste preživaca, utvrđena je i različita razina pokrivenosti cijepljenjem na području regija Hrvatske pa su tako županije na području gorske Hrvatske i južnog hrvatskog primorja značajno odstupale od prosjeka procijepljenosti u ostatku zemlje u negativnom kontekstu. U 2016. godini nakon druge provedene kampanje cijepljenja, utvrđeno je da je u 11 od 21 županije postotak

procijepljenih goveda bio niži od 90%. Serološki pozitivne sentinel životinje pronađene su na području tih 11 županija, a virus dokazan na području 10 županija. Upravo su i županije s dokazanom cirkulacijom virusa u sentinel životinja bile one s nižom razinom procijepljenosti. Različita razina procijepljenosti preživača po regijama uočena je svojedobno i u Italiji, što je imalo jasne posljedice na cirkulaciju virusa jer se cijepljenjem nije uspjelo značajnije smanjiti širenje BPJ (PATTA i sur., 2004.). Tijekom cijelog vremena trajanja kampanje cijepljenja u niti jednoj županiji nisu zabilježeni klinički znakovi bolesti. U našem istraživanju procjena učinka cijepljenja ustanovljena je primjenom odgovarajućih modela kojima je ispitivana vjerojatnost otkrivanja seropozitivnih životinja uzimajući u obzir županiju kao najvišu hijerarhijsku razinu na koju se trebaju usmjeriti mjere te utjecaj godine obzirom na činjenicu da koze nisu bile cijepljene u zadnjoj godini kampanje. Univarijabilna analiza prvo je učinjena za godinu provedbe cijepljenja, a potom i za sve druge varijable (cijepljenje životinje te cijepljena stada za svaku individualnu vrstu preživača te za preživače ukupno). Dobiveni rezultati potom su grupirani u četiri modela te je u konačnici primjenom Akaikeovog i Bayesovog informacijskog kriterija izvršen odabir najboljeg modela u odnosu na dobivene podatke. Rezultati univarijabilne i multivarijabilne logističke regresije svih provedenih analiza ukazali su da s porastom postotka cijepljenih životinja i stada vjerojatnost da se otkriju seropozitivne životinje eksponencijalno opada za goveda i koze. Isto međutim nije utvrđeno i za ovce za koje je analiza utvrdila da s porastom postotka cijepljenih životinja i stada raste i vjerojatnost da se otkriju seropozitivne životinje, a što svakako nije bio očekivani nalaz. Nekoliko mogućih razloga za takav nalaz nametnulo se tijekom razmatranja svih dostupnih podataka. Primjerice, način držanja goveda i ovaca na području županija smještenih u sjevernom i južnom dijelu zemlje nije istovjetan. Županije južnog hrvatskog primorja karakterizira uglavnom ekstenzivna proizvodnja na gospodarstvima s implementiranom niskom razinom biosigurnosnih mjera te je učestalije pašno držanje, pri čemu životinje veći dio godine borave na otvorenom ili u

poluotvorenim objektima. Takav način držanja omogućava jednostavniju interakciju između domaćina i vektora pa je time i vjerojatnost od izbijanja bolesti ili održavanja cirkulacije virusa na određenoj razini viša. Uočene su i određene nelogičnosti u tehničkim podacima vezane uz denominator brojnog stanja životinja u određenim županijama. Tako je na području Brodsko-posavske županije ukupan broj ovaca u 2019. godini porastao za više od 50% u odnosu na prethodna razdoblja, dok je broj gospodarstava ovaca ostao nepromijenjen. Također postoji značajan nesrazmjer u broju gospodarstava te provedbi mjere cijepljenja ovaca 2018. i 2019. godine kada je cijepljeno 57,41%, odnosno 32,02% ovaca na 96,67% odnosno 93,60% gospodarstava. Dodatnim analizama baze JRDŽ u odnosu na navedeno uočena je greška u sustavu uzrokovana nepravilnostima u ažuriranju brojnog stanja životinja što daje zaključiti da postojeći faktori korekcije u bazi koji bi upućivali na nelogičnosti nastale unosom podataka nisu dostatni. Razmatrana je i moguća interferencija maternalnih protutijela ili prirodno stečenog imuniteta na rezultat cijepljenja. Prijašnja istraživanja navode da maternalna protutijela interferiraju s imunim odgovorom na cijepljenje najmanje tri mjeseca, dok je za potpuni gubitak maternalnih protutijela potrebno od pet do devet (u prosjeku sedam) mjeseci (LEEMANS i sur., 2013.; EFSA, 2017.). Druga pak istraživanja ukazuju da se specifična protutijela u krvi mogu naći i do 33 mjeseca nakon prirodne infekcije (WARD i sur., 1997.). Kriterij odabira sentinel životinje u RH uključivao je kategoriju starosti životinje, njezin cjepni status te status serološkog pretraživanja ukoliko je isti bio poznat za prethodne godine. Ipak, nije moguće u potpunosti isključiti utjecaj maternalnih protutijela ili prirodno stečenog imuniteta na dobivene rezultate u ovaca. Kako su goveda bila dominantni sentineli te je u goveda i koza utvrđena statistički značajna povezanost između postotka procijepljenosti i seropozitivnosti, za pretpostaviti je da navedeno nema značajniji utjecaj na rezultat.

Uspoređujući višegodišnju dinamiku i opseg provedbe programa nadziranja nekih drugih bolesti ovaca kao što je nadziranje bruceloze, uočeno je da na području županija gorske

Hrvatske i južnog hrvatskog primorja opseg provedbe mjera u prosjeku iznosi svega 65,12% (30,3 – 85,3%). Kako su se mjere cijepljenja BPJ i uzorkovanja radi bruceloze trebale provoditi istovremeno, postavlja se pitanje kako je u istom stadu, u isto vrijeme jedan program proveden na najviše 65% životinja, a drugi i na preko 80% životinja kao što je bilo slučaj za BPJ. Obje mjere bila su besplatne za posjednike, a troškovi rada veterinarima i cjeviva u potpunosti financirani iz sredstava državnog proračuna. Kako je broj cijepljenih životinja izravno povezan sa plaćanjem usluge, postoji visoka vjerojatnost da su u bazu podataka o cijepljenim životinjama uneseni podatci i za životinje koje stvarno nikada nisu bile cijepljene. Kontrola cjepnog imuniteta preživača provedena je samo jednom na ograničenom broju životinja, odmah nakon prve kampanje cijepljenja, tijekom koje je utvrđen odgovarajući serološki odgovor u 95,88% životinja. Nadalje, u prve tri godine provedbe cijepljenja postotak cijepljenih preživača bio je u stalnom, ali blagom porastu, dok nakon toga isti opada. Pad postotka cijepljenih životinja može biti posljedica smanjenja percepcije veterinarima i posjednika o značaju i posljedicama zbog izostanka kliničkih znakova bolesti ili potvrđenih slučajeva u sentinel životinja.

Zaključno, temeljem provedene sveobuhvatne analize utvrđeni su ključni čimbenici koje treba uzeti u obzir prilikom kreiranja budućih mjera kontrole i prevencije BPJ. Naši rezultati potvrđuju kako bi praćenje pojedinih klimatskih čimbenika uz praćenje pojave i kretanja BPJ u zemljama u okruženju moglo poslužiti za rano alarmiranje sustava te poduzimanje potrebnih mjera i prije nego se bolest unese na područje RH. Sustav ranog prepoznavanja bolesti kao i ograničeno širenje bolesti utvrđeno u ovom istraživanju upućuju na činjenicu da je kontinuirano obnavljanje znanja i podizanje svijesti veterinarima i posjednika životinja o ranom prepoznavanju bolesti ključno za poduzimanje pravovremenih mjera i aktivnosti. Nadalje, istraživanjem je dokazano da je statistički najznačajnija varijabilnost utvrđena na razini županije što znači da je ta administrativna jedinica i najpogodnija za usmjeravanje svih mjera.

Prospektivno planiranje strategije zasnovane na navedenim ključnim čimbenicima u izravnoj je vezi s mogućnošću prikupljanja podataka, provjere postupka te procjeni i njihovu integriranju. Tijekom izrade ove disertacije analizirani su svi dostupni podatci vezani uz petogodišnje razdoblje provedbe mjera nadziranja i prevencije BPJ u RH te su u konačnici utvrđeni postojeći nedostaci sustava koji imaju izravan utjecaj na krajnju učinkovitost i željene ciljeve. Vođenje baza podataka o brojnom stanju populacije osnovni je korak u planiranju mjera te osiguranju potrebnih financijskih sredstava, stoga isto mora biti redovito ažurirano s minimalnom mogućnošću uplitanja ljudskog faktora u negativnom smislu. Također, ključno je i krajnje neophodno omogućiti svakodnevnu kontrolu provedbe mjera kroz kvalitetno ustrojene epidemiološke baze podataka. Takvim bazama lako bi se pratio tijek svih postupaka te provjere određenih aktivnosti poduzetih od veterinarara na terenu do zaključno laboratorijske dijagnostike, određivanja mjera ili trošenja financijskih sredstava. Podatci se moraju moći prikupljati, analizirati i provjeravati i tijekom provede programa jer se time omogućavaju korekcije i najbolja moguća prilagodba određenih mjera situaciji na terenu.

U konačnici ovako razvijen pristup nije primjenjiv samo na kontrolu i prevenciju BPJ već bi se kao znanstveni temelj mogao primijeniti i za planiranje nacionalnih strategija kontrole ostalih vektorskih zaraznih bolesti životinja.

7. ZAKLJUČCI

1. Zadnji unos bolesti plavog jezika u Republiku Hrvatsku posljedica je pasivnog transporta zaraženih komarčića vjetrom, a cirkulaciju serotipova karakterizirala je neujednačena distribucija.
2. U ukupnom uzorku pobol i pomor bio je nizak, a analizom varijance na tri hijerarhijske administrativne razine, u svim modelima i kombinacijama, najveća razina varijabilnosti utvrđena je na razini županije.
3. Od svih analiziranih klimatoloških čimbenika koji mogu utjecati na pojavnost BPJ, uporabom univarijabilnih i multivarijabilnih regresijskih modela, statistički značajna povezanost utvrđena je samo za temperaturu.
4. Usporedba rezultata cijepljenja i ukupne prevalencije upućuje da je cijepljenje dovelo do smanjenja prevalencije i da je postotak seropozitivnih stada smanjen, ali bez potpune eliminacije infekcije.
5. Uzimajući u obzir sve utvrđene osobitosti BPJ u RH definirani su ključni čimbenici koje bi trebalo uzeti u obzir u razvoju novog pristupa mjerama kontrole i prevencije BPJ, od kojih su najvažniji: razvoj modela praćenja bolesti koji bi osigurali rano alarmiranje sustava i poduzimanje potrebnih mjera i prije nego se bolest unese na područje RH; prilagođeno usmjeravanje mjera na razinu najveće varijabilnosti – županiju; ustrojavanje epidemioloških baza podataka kako bi se podatci mogli prikupljati, analizirati i provjeravati tijekom provedbe programa omogućavajući time korekcije i prilagodbu propisanih mjera trenutnoj situaciji.

8. PRILOZI

8.1. Popis slika

Slika 1. Shema strukturnih proteina i RNA segmenata.....	8
Slika 2. Geografska distribucija BPJ u razdoblju 1998. – 2021. prema klimatskim zonama pripremljenim uporabom FAO GeoNetwork	10
Slika 3. Put unosa raznih serotipova virusa BPJ u Europu	12
Slika 4. Komarčić roda <i>Culicoides spp.</i> (adult)	15
Slika 5. Prikaz krila nekih vrsta komarčića roda <i>Culicoides</i> prisutnih u Europi	15
Slika 6. Geografska distribucija komarčića roda <i>Culicoides</i>	20
Slika 7. Prijenos virusa BPJ	23
Slika 8. Mukozni iscjedak iz nosa	30
Slika 9. Sasušeni sekret i kraste na usnama i nosu	30
Slika 10. Edem usana i glave, cijanoza jezika.....	31
Slika 11. Krvarenja, erozije i ulceri na sluznici usne šupljine	31
Slika 12. Crvenilo i otečenje krunskog ruba	32
Slika 13. Pogrbljen stav uzrokovan bolnošću papaka	32
Slika 14. Krvarenja uočena u različitim organima (A) sluznica usta, (B) jezik, (C) preskapularni limfni čvor i (D) plućna arterija	36
Slika 15. Prostorna distribucija stada s utvrđenim kliničkim znakovima BPJ u 2001. godini. 50	
Slika 16. Prostorna distribucija sentinel goveda, distribucija goveda u kojih je utvrđena serokonverzija na serotip 9 u razdoblju 14. listopada – 16. studeni 2002.	51
Slika 17. Sentinel stada u kojih je dokazana infekcija serotipom 16 na području Hrvatske i Italije u vremenu od lipnja do rujna 2004. Prikaz i položaj meteoroloških postaja s kojih su prikupljeni podaci o vjetru.....	54
Slika 18. Kretanje BPJ serotipa 4 tijekom 2014. – 2015. godine.....	56
Slika 19. Prikaz potvrđenih slučajeva BPJ u Hrvatskoj sa zonama ograničenja u vremenskom razdoblju od listopada 2014. do lipnja 2015.	56
Slika 20. Prikaz potvrđenih slučajeva BPJ u RH tijekom 2016. godine	60
Slika 21. Područja potvrđenih slučajeva BPJ u listopadu 2020. godine	61
Slika 22. Suvremena regionalna podjela Republike Hrvatske	66
Slika 23. Prikaz gustoće naseljenosti goveda na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	88
Slika 24. Prikaz gustoće naseljenosti ovaca na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	89
Slika 25. Prikaz gustoće naseljenosti koza na razini naselja i godine u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	90
Slika 26. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstva goveda i broja goveda u RH 2015.-2019.....	91
Slika 27. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstva ovaca i broja ovaca u RH 2015.-2019. godine	91
Slika 28. Grafički prikaz dinamike kretanja broja gospodarstva koza i broja koza u RH 2015.-2019. godine	92
Slika 29. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže goveda u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	93
Slika 30. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže ovce u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	94

Slika 31. Prikaz gustoće gospodarstava na kojima se drže koze u RH tijekom razdoblja 2015. do 2019. godine	95
Slika 32. Broj životinja s utvrđenim kliničkim znakovima BPJ i broj uginulih u odnosu na ukupan broj sumnjivih životinja po vrsti tijekom 2014. i 2015. godine	96
Slika 33. Grafički prikaz pobola i pomora izražen u postotku po vrsti preživača i godini	97
Slika 34. Grafički prikaz broja pretraženih stada individualne vrste preživača (po vrsti životinje) u odnosu na ukupan broj stada preživača pretraženih radi kliničke sumnje na BPJ	99
Slika 35. Grafički prikaz broja stada individualne vrste preživača pretraženih radi sumnje iz drugih razloga u odnosu na ukupan broj pretraženih stada preživača.....	99
Slika 36. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka imunoenzimnim testom 2014. godine po vrsti uzorkovane životinje	100
Slika 37. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka imunoenzimnim testom 2015. godine po vrsti uzorkovane životinje	101
Slika 38. Grafički prikaz broja serološki pozitivnih gospodarstava/stada po vrsti preživača tijekom 2014. i 2015. godine uzorkovanih zbog postavljene kliničke sumnje	101
Slika 39. Prikaz distribucije serološki pozitivnih preživača u odnosu na ukupnu seroprevalenciju na razini naselja tijekom kliničke faze epizootije	103
Slika 40. Grafički prikaz serološki pozitivnih stada pretraženih imunoenzimnim testom zbog sumnje iz drugih razloga tijekom 2014. i 2015. godine	104
Slika 41. Prikaz distribucije potvrđenih slučajeva BPJ metodom RT-PCR u preživača u odnosu na ukupnu utvrđenu prevalenciju na razini naselja tijekom kliničke faze epizootije.....	106
Slika 42. Tjedna incidencija izražena kao broj BPJ pozitivnih stada za svaku pojedinu vrstu preživača tijekom kliničke faze epizootije	107
Slika 43. Ruža vjetrova za mjernu postaju Dubrovnik tijekom razdoblja od 2009.-2013. i 2014. godine	112
Slika 44. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije	115
Slika 45. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne minimalne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije	116
Slika 46. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječne maksimalne tjedne temperature metodom LOESS neparametrijske regresije	117
Slika 47. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa vrijednostima vlage metodom LOESS neparametrijske regresije.....	117
Slika 48. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa brzinom vjetrova metodom LOESS neparametrijske regresije.....	118
Slika 49. Grafički prikaz povezanosti slučajeva BPJ sa oborinama metodom LOESS neparametrijske regresije.....	118
Slika 50. Grafički prikaz dinamike uzorkovanja radi pretraživanja imunoenzimnim testom ELISA tijekom faze aktivne kontrole epizootije.....	122
Slika 51. Grafički prikaz ukupnog broja pretraženih uzoraka po županiji tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije	123
Slika 52. Grafički prikaz kumulativne mjesečne dinamike uzorkovanja i laboratorijskog pretraživanja uzoraka od 2015. do 2019. godine	124
Slika 53. Grafički prikaz broja pozitivnih i negativnih uzoraka pretraženih imunoenzimnim testom mjesečno tijekom faze aktivne kontrole epizootije	125
Slika 54. Grafički prikaz omjera negativnih i seropozitivnih uzoraka od 2015. do 2019. godine	126
Slika 55. Prikaz utvrđene seroprevalencije na razini županije i godine za razdoblje od 2015. do 2019. godine	127

Slika 56. Trend kretanja kumulativne seroprevalencije prikazane na mjesečnoj razini tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije	128
Slika 57. Grafički prikaz broja pretraženih uzoraka prema vrsti sentinel životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije	129
Slika 58. Grafički prikaz kumulativne seroprevalencije po vrsti životinje tijekom faze aktivne kontrole epizootije.....	129
Slika 59. Grafički prikaz dinamike uzorkovanja i ukupnog broja uzoraka pretraženih metodom RT-PCR od 2015. do 2019. godine	130
Slika 60. Ukupan broj uzoraka dostavljenih na laboratorijsko pretraživanje metodom RT-PCR po županiji tijekom razdoblja faze aktivne kontrole epizootije	131
Slika 61. Grafički prikaz kumulativne mjesečne dinamike uzorkovanja i laboratorijskog pretraživanja metodom RT-PCR za razdoblje 2015. – 2019. godine.....	132
Slika 62. Grafički prikaz pozitivnih uzoraka metodom RT-PCR mjesečno za razdoblje 2015. – 2019. godine	133
Slika 63. Grafički prikaz ukupnog broja pretraženih i pozitivnih uzoraka metodom RT-PCR mjesečno od 2015. – 2019. godine	134
Slika 64. Grafički prikaz godišnje prevalencije BPJ na razini stada u razdoblju 2015. – 2019. godine	134
Slika 65. Grafički prikaz prevalencije po županijama i godini pretraživanja za razdoblje faze aktivne kontrole epizootije	135
Slika 66. Grafički prikaz broja cijepljenih stada preživača u odnosu na ukupan broj stada preživača.....	137
Slika 67. Grafički prikaz broja cijepljenih preživača u odnosu na ukupan broj preživača	137
Slika 68. Grafički prikaz postotka cijepljenih preživača u odnosu na postotak cijepljenih stada	138
Slika 69. Grafički prikaz učinka cijepljenja goveda u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija).....	148
Slika 70. Grafički prikaz učinka cijepljenja koza u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija).....	148
Slika 71. Grafički prikaz učinka cijepljenja ovaca u odnosu na seropozitivnost u razdoblju 2015. – 2019. (LOESS neparametrijska regresija).....	149
Slika 72. Prikaz postotka pozitivno pretraženih uzoraka kontrole cjepnog imuniteta na razini županije tijekom 2015. godine.	150
Slika 73. Vrste komarčića roda <i>Culicoides</i> utvrđene u Hrvatskoj od 2015. do 2019. godine	152
Slika 74. Grafički prikaz omjera ukupnog broja dostavljenih komarčića (%) po županiji od 2015. do 2019. godine	155
Slika 75. Grafički prikaz prosječne mjesečne vrijednosti broja komarčića <i>Culicoides spp</i> prikupljenih tijekom razdoblja od 2015. do 2019. godine	156
Slika 76. Mjesečna dinamika aktivnosti <i>Culicoides spp.</i> od 2015. do 2019. godine	156
Slika 77. Grafički prikaz mjesečne dinamike pretraživanja skupnih uzoraka komarčića <i>Culicoides</i> prikupljenih u relevantnom razdoblju od 2015. do 2019. godine	157

8.2. Popis tablica

Tablica 1. Metode laboratorijske dijagnostike BPJ.....	37
Tablica 2. Varijable vezane uz podatke o laboratorijskim pretragama	68
Tablica 3. Vremensko razdoblje provedbe aktivnog nadziranja od 2015. do 2019. godine	78
Tablica 4. Podatci o brojnom stanju preživača u RH u 2014. godini.....	84
Tablica 5. Broj stada i životinja na razini županije i naselja u regiji Dalmacija 2014. godine	84
Tablica 6. Stada preživača prema veličini i prosječnom broju životinja na razini županije ...	85
Tablica 7. Ukupan broj gospodarstava preživača i broja životinja u RH tijekom razdoblja 2015. - 2019. godine.....	86
Tablica 8. Ukupan broj gospodarstava i životinja individualne vrste preživača u RH za 2015. - 2019. godinu.....	86
Tablica 9. Klinički znakovi u odnosu na učestalost pojave po vrsti životinje zabilježeni 2014. godine	98
Tablica 10. Seropozitivna stada i životinje unutar pretražvanih županija tijekom kliničke faze epizootije	102
Tablica 11. Rezultati pretraživanja stada i životinja metodom RT-PCR tijekom kliničke faze epizootije prema razlogu pretraživanja	105
Tablica 12. Rezultati pretraživanja stada metodom RT-PCR na razini županije tijekom kliničke faze epizootije	105
Tablica 13. Podatci o kumulativnoj incidenciji (KI) na razini pretraženih stada i životinja po godini i mjesecima	108
Tablica 14. Usporedba zaraženih stada preživača i životinja sa gustoćom gospodarstava i ukupnom populacijom preživača na razini županije	108
Tablica 15. Broj županija, naselja, stada i ovaca uključenih u pretraživanje radi kliničke sumnje po hijerarhijskim razinama	109
Tablica 16. Rezultati analize varijance za četiri različita modela provedene na rezultatima imunoenzimnog testa ovaca pretraženih radi kliničke sumnje tijekom faze aktivne kontrole epizootije	110
Tablica 17. Rezultati provedbe virus neutralizacijskog testa 2014. i 2015. godine.....	110
Tablica 18. Deskriptivna statistika klimatoloških i drugih čimbenika korištenih u epidemiološkoj analizi njihove povezanosti s brojem slučajeva BPJ na razini županije	113
Tablica 19. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima srednje dnevne temperature u univarijabilnoj analizi.....	114
Tablica 20. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima prosječnog tjednog temperaturnog minimuma u univarijabilnoj analizi	115
Tablica 21. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima maksimalne dnevne temperature u univarijabilnoj analizi.....	116
Tablica 22. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima četverotjednog kumulativa u univarijabilnoj analizi.....	119
Tablica 23. Povezanost slučajeva BPJ sa vrijednostima četverotjednog kumulativa i temperaturnim prosjekom u multivarijabilnoj analizi.....	119
Tablica 24. Broj goveda prema županiji dopreme na područje Dubrovačko-neretvanske županije 2014. godine	120
Tablica 25. Broj goveda prema županiji otpreme s područja Dubrovačko-neretvanske županije 2014. godine.....	121
Tablica 26. Rezultati cijepljenja preživača od 2015. do 2019. godine.....	136
Tablica 27. Rezultati cijepljenja goveda od 2015. do 2019. godine	138
Tablica 28. Rezultati cijepljenja ovaca od 2015. do 2019. godine.....	139
Tablica 29. Rezultati cijepljenja koza od 2015. do 2018. godine	139

Tablica 30. Rezultati cijepljenja goveda od 2015. do 2019. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.).....	140
Tablica 31. Rezultati cijepljenja ovaca od 2015. do 2019. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.).....	141
Tablica 32. Rezultati cijepljenja koza od 2015. do 2018. godine izraženi u % cijepljenih gospodarstava (gosp.) i % cijepljenih životinja (živ.).....	142
Tablica 33. Univarijabilna analiza učinka cijepljenja na razini godine za razdoblje 2015. do 2019. u odnosu na ishod seropozitivnosti s uključenom županijom kao stohastičkim elementom.....	144
Tablica 34. Rezultati analize postotka cijepljenih životinja i stada u odnosu na ishod seropozitivnosti s uključenom županijom i godinom.....	145
Tablica 35. Rezultati analize postotka cijepljenih životinja u odnosu na seropozitivnost tijekom razdoblja 2015.-2019. godine za goveda i koze načinjeni multivarijabilnom logističkom regresijom.....	146
Tablica 36. Rezultati analize postotka cijepljenih životinja u odnosu na seropozitivnost tijekom razdoblja 2015.-2018. godine za goveda i koze načinjeni multivarijabilnom logističkom regresijom.....	147
Tablica 37. Rezultati provedbe programa entomološkog nadziranja u razdoblju od 2015. do 2019. godine.....	151
Tablica 38. Broj dostavljenih uzoraka prikupljenih iz lampi hvataljki od 2015. do 2019. godine na razini županije.....	153
Tablica 39. Broj komarčića <i>Culicoides</i> prikupljenih po županiji od 2015. do 2019. godine.	154
Tablica 40. Ukupan broj skupnih uzoraka komarčića roda <i>Culicoides</i> spp .pretraženih u razdoblju 2015. do 2019. godine.....	157

8.3. Popis kratica

AGID	Agar gel imunodifuzija
AIC	Akaikeov informacijski kriterij
BPJ	Bolest plavog jezika
c-ELISA	Kompetitivni imunoenzimni test
CI	Interval pouzdanosti
CPU	Citopatogeni učinak
DEET	di-etil toulamid
DHMZ	Državni hidrometeorološki zavod
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane
EHDV	Epizootijska hemoragijska bolest
ELISA	Imunoenzimni test
EU	Europska unija
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu (eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
GDP	Gel difuzijska precipitacija
ICTV	Međunarodni odbor za taksonomiju virusa
JIBG	Jedinstveni identifikacijski broj gospodarstva
JRDŽ	Jedinstveni registar domaćih životinja
KI	Kumulativna incidencija
Max.	Maksimum
Min.	Minimum

OIE	Svjetska organizacija za zdravlje životinja (eng. World organisation for animal health)
OR	Omjer izgleda
prc	Postotak
RH	Republika Hrvatska
RNK	Ribonukleinska kiselina
RR	Relativni rizik
RT-PCR	Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu
SD	Standardna devijacija
SP	Standardna pogreška
VN	Neutralizacija virusa

9. LITERATURA

ALKHAMIS M. A., C. AGUILAR-VEGA, N.M. FOUNTAIN-JONES, K. LIN, A.M. PEREZ., J.M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2020): Global emergence and evolutionary dynamics of bluetongue virus. *Sci. Rep.* 10, 21677. doi: 10.1038/s41598-020-78673-9.

ALPAR, H. O., V. W. BRAMWELL, E. VERONESI, K. E. DARPEL, P. P. PASTORET, P. P. C. MERTENS (2009): Bluetongue virus vaccines past and present. In: *Bluetongue*. (Mellor P. S., M. Baylis, P. P. C. Mertens, Eds.), Elsevier Academic Press, London, pp. 397–428.

ANONYMOUS (2021): OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Part 3, Section 3.1., Chapter 3.1.3. (Version adopted in May 2021.), https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETONGUE.pdf.

ANONYMOUS (2021): OIE Technical Disease Card: Bluetongue; <https://www.oie.int/en/document/bluetongue/>.

ANONYMOUS (2021): OIE World Animal Health Information System. OIE WAHIS Analytics <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>.

BACKX, A., C. G. HEUTINK, E. M. VAN ROOIJ, P. A. VAN RIJN (2007): Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 161, 591-592.

BARRATT-BOYES, S. M., N. J. MACLACHLAN (1995): Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 9, 1322-1329.

BARRATT-BOYES, S. M., P. V. ROSSITTO, J. L. STOTT, N. J. MACLACHLAN (1992): Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 73, 1953–1960.

BARRATT-BOYES, S., N. J. MACLACHLAN (1994): Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet. Microbiol.* 40, 361–371.

BARROS, S., C. B. CRUZ, T. M. LUÍS, F. RAMOS, T. FAGULHA, M. DUARTE, M. HENRIQUES, M. FEVEREIRO (2009): A DIVA system based on the detection of antibodies to non-structural protein 3 (NS3) of bluetongue virus. *Vet. Microbiol.* 137, 252-259.

BATTEN, C., K. DARPEL, M. HENSTOCK, P. FAY, E. VERONESI, S. GUBBINS (2014): Evidence for Transmission of Bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS ONE* 9, e96049. doi:10.1371/journal.pone.0096049.

BEKKER, J. G., G. DE KOCK, J. B. QUINLAN (1934): The occurrence and identification of bluetongue in cattle – the so-called pseudo foot-and-mouth disease in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 2, 393–507.

BELHOUCHE, M., F. MOHD JAAFAR, A. E. FIRTH, J. M. GRIMES, P. P. C. MERTENS, H. ATTOUI (2011): Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PLoS ONE*. 6, e25697. doi:10.1371/journal.pone.0025697.

- BESSELL, P. R., D. J. SHAW, N. J. SAVILL, M. E. WOOLHOUSE (2010): Statistical modeling of holding level susceptibility to infection during the 2001 foot and mouth disease epidemic in Great Britain. *Int. J. Infect. Dis.* 14, 210–215.
- BHANUPRAKASH, V., B. K. INDRANI, M. HOSAMANI, V. BALAMURUGAN, R. K. SINGH (2009): Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Vaccines*. 8, 191– 204. doi: 10.1586/14760584.8.2.191.
- BLANDA, V., M. BLANDA, F. LA RUSSA (2018): Geo-statistical analysis of *Culicoides* spp. distribution and abundance in Sicily, Italy. *Parasite Vectors* 11, 78. doi: 10.1186/s13071-018-2658-2.
- BOENDER, G.J., T. J. HAGENAARS, A. R. ELBERS (2014): Confirmation of spatial patterns and temperature effects in Bluetongue virus serotype-8 transmission in NW-Europe from the 2007 reported case data. *Vet. Res.* 45, 75. doi: 10.1186/s13567-014-0075-x.
- BONNEAU, K. R, C. D. DEMAULA, B. A. MULLENS, N. J. MACLACHLAN (2002): Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 88, 115-125.
- BOORMAN, J.P.T., D.V. HAGAN (2007): A Name List of World *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae); http://campus.belmont.edu/cienews/Culicoides_worldlist.html
- BORKENT, A. (2014a): The subgeneric classification of species of *Culicoides* – thoughts and a warning, updated: 20th January 2014, available at: <https://www.inhs.illinois.edu/files/4514/6410/0252/CeratopogonidaeCatalog.pdf> Columbia Museum, American Museum of Natural History and Instituto Nacional de Biodiversidad, Salmon Arm, British Columbia, Canada.
- BOSNIĆ, S., R. BECK, LISTEŠ, I. LOJKIĆ, G. SAVINI, B. ROIĆ (2015): Bluetongue virus in Oryx antelope (*Oryx leucoryx*) during the quarantine period in 2010 in Croatia. *Vet. Ital.* 51, 139-43.
- BOUWKNEGT, C., P. A. VAN RIJN, J. M. SCHIPPER, D. HOLZEL, J. BOONSTRA, A. M. NIJHOF, M. A. VAN ROOIJ, F. JONGEJAN (2010): Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Exp. Appl. Acarol.* 52, 183–92.
- BRAVERMAN, F., F. CHECHIK, Y. CHECHIK (1996): Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israël. *Rev. sci. tech. OIE.* 15, 1037-1052.
- BREWER, A. W., N. J. MACLACHLAN (1992): Ultrastructural characterization of the interaction of bluetongue virus with bovine erythrocytes in vitro. *Vet. Pathol.* 29, 356-359. doi: 10.1177/030098589202900412.
- BRUGGER, K., F. RUBEL (2013): Characterizing the species composition of European *Culicoides* vectors by means of the Köppen-Geiger climate classification. *Parasite Vectors* 6, 333. doi:10.1186/1756-3305-6-333.

- BUMBAROV V, N. GOLENDER, M. JENCKEL, K. WERNIKE, M. BEER, E. KHINICH, O. ZALESKY, O. ERSTER (2020): Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 171-182. doi: 10.1111/tbed.13338.
- BUMBAROV, V., J. BRENNER, D. ROTENBERG, C. BATTEN, B. SHARIR, A. GOROHOV, N. GOLENDER, T. SHAININ, G. KANIGSWALD, I. ASIS, C. OURA (2012): The presence and possible effects of bluetongue virus in goat herds in Israel. *Isr. J. Vet. Med.* 67, 237-243.
- BURGIN, L. E., J. GLOSTER, C. SANDERS, P.S. MELLOR, S. GUBBINS, S. CARPENTER (2012): investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance *Culicoides* biting midge dispersal. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 263–272.
- CALISTRI, P, A. GIOVANNINI, A. CONTE, D, NANNINI, U. SANTUCCI, C. PATTA, S. ROLESU, V. CAPORALE (2004a): Bluetongue in Italy: part I. *Vet. Ital.* 40, 243 –251.
- CALISTRI, P., M. GOFFREDO, V. CAPORALE, R. MEISWINKEL (2003): The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J. Vet. Med.* 50, 132-138.
- CAPORALE, M., L. DIGIALLEONORADO, A. JANOWICZ, G. WILKIE, A. SHAW, G. SAVINI, P. A. VAN RIJN, P. MERTENS, M. DI VENTURA, M. PALMARINI (2014): Virus and host factors affecting the clinical outcome of bluetongue virus infection. *J. Virol.* 88, 10399-10411. doi:10.1128/JVI.01641-14.
- CAPORALE, V., A. GIOVANNINI (2010): Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review. *Rev. Sci. Tech.* 29, 573-591. doi: 10.20506/rst.29.3.2001.
- CAPORALE, V., A. GIOVANNINI, C. PATTA, P. CALISTRI, D. NANNINI, U. SANTUCCI (2004): Vaccination in the control strategy of bluetongue in Italy. *Dev. Biol. (Basel)* 119, 113-127.
- CARVELLI, A., M. SALA, G. L. AUTORINO, M. T. SCICLUNA, F. IACOPONI, P. ROMBOLÀ, P. SCARAMOZZINO, A. M. SAMY (2019): A cross-sectional serosurvey in a sheep population in central Italy following a bluetongue epidemic. *PLoS One.* 14, e0208074. doi: 10.1371/journal.pone.0208074.
- CELMA, C. C., P. ROY (2009): A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J. Virol.* 83, 6806–6816. doi: 10.1128/JVI.00263-09.
- COETZEE, P., M. STOKSTAD, E. H VENTER., M. MYRMEL, M. METTE VAN VUUREN (2012): Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *J. Virol.* 9, 198. doi: 10.1186/1743-422X-9-198.
- CONRATHS, F. J., J. M. GETHMANN, C. STAUBACH, T. C. METTENLEITER, M. BEER, B. HOFFMANN (2009): Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 433-435. doi: 10.3201/eid1503.081210.
- CONTE, A., M. GOFFREDO, C. IPPOLITI, R. MEISWINKEL (2007): Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* Complex in Italy. *Vet. Parasitol.* 150, 333-344.

COOK, G. (1992): Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. *J. R. Soc. Med.* 85, 688–691.

COURTEJOIE, N., B. DURAND, L. BOURNEZ, A. GORLIER, E. BRÉARD, C. SAILLEAU, D. VITOUR, S. ZIENTARA, F. BAURIER, C. GOURMELEN, F. BENOIT, H. ACHOUR, C. MILARD, S. POLIAK, C. PAGNEUX, C. VIAROUGE, G. ZANELLA (2018): Circulation of bluetongue virus 8 in French cattle, before and after the re-emergence in 2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 281-284. doi: 10.1111/tbed.12652.

COX, H. R. (1954): Bluetongue. *Bacteriol. Rev.* 18, 239-253.

DAMOS, P., M. SAVOPOULOU-SOULTANI (2012): Temperature-Driven Models for Insect Development and Vital Thermal Requirements. *Psyche* 2012, 1-13. doi: 10.1155/2012/123405.

DARPEL, K. E., C. A. BATTEN, E. VERONESI, A. E. SHAW, S. ANTHONY, K. BACHANEK-BANKOWSKA, L. KGOSANA, A. BIN-TARIF, S. CARPENTER, U. U. MULLER-DOBLIES, H. H. TAKAMATSU, P. S. MELLOR, P. P. MERTENS, C. A. OURA (2007): Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet. Rec.* 161, 253–261.

DARPEL, K. E., P. MONAGHAN, J. SIMPSON, S. J. ANTHONY, E. VERONESI, H. W. BROOKS, H. ELLIOTT, J. BROWNLIE, H. H. TAKAMATSU, P. S. MELLOR, P. P. MERTENS (2012): Involvement of the skin during bluetongue virus infection and replication in the ruminant host. *Vet. Res.* 43, 40. doi: 10.1186/1297-9716-43-40.

DE DIEGO, A., C. PÉREZ, P. J. SÁNCHEZ-CORDÓN, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2014): Bluetongue in Spain: From the First Outbreak to 2012. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 1-11. doi: 10.1111/tbed.12068.

DE LIBERATO, C., F. FARINA, A. MAGLIANO, P. ROMBOLÀ, F. SCHOLL, V. SPALLUCCI, P. SCARAMOZZINO (2010): Biotic and abiotic factors influencing distribution and abundance of *Culicoides obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae) in central Italy. *J. Med. Entomol.* 47, 313-318. doi: 10.1603/me09148.

DEMAULA, C. D., M. A. JUTILA, D. W. WILSON, N. J. MACLACHLAN (2001): Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 82, 787–794. doi: 10.1099/0022-1317-82-4-787.

DEMAULA, C. D., C. M. LEUTENEGGER, K. R. BONNEAU, N. J. MACLACHLAN (2002): The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology* 296, 330-337. doi: 10.1006/viro.2002.1476.

DEMAULA, C. D., K. R. BONNEAU, B. A. MULLENS, N. J. MACLACHLAN (2001): Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 88, 115-125. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00106-2.

DERCKSEN, D., N. GROOT NIBBELINK, R. PAAUWE, A. BACKX, P. VAN RIJN, P. VELLEMA (2007): First outbreak of bluetongue in goats in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 132, 786–790.

DESMECHT, D., R. V. BERGH, A. SARTELET, M. LECLERC, C. MIGNOT, F. MISSE, C. SUDRAUD, S. BERTHEMIN, S. JOLLY, B. MOUSSET (2008): Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Vet. Rec.* 163, 50–52. doi: 10.1136/vr.163.2.50.

DOHOO, I. R., E. TILLARD, H. STRYHN, B. FAYE (2001): The use of multilevel models to evaluate sources of variation in reproductive performance in dairy cattle in Reunion Island. *Prev. Vet. Med.* 50, 127–144. doi: 10.1016/s0167-5877(01)00191-x.

DOHOO, I., S. W. MARTIN, H. STRYHN (2010): *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd Ed., 2. Print., Charlottetown, Canada.

DU TOIT, R.M. (1944): The transmission of bluetongue and horsesickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Anim. Ind.* 19, 7–16.

DUCHEYNE, E., R. DE DENKEN, S. BECU, B. CODINA, K. NOMIKOU, O. MANGANA, G. GEORGIEV, B. V. PURSE, G. HENDRICKX (2007): Quantifying the wind dispersal of *Culicoides* species in Greece and Bulgaria. *Geospat. Health.* 2, 177–189.

EFSA AHAW PANEL (EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE) (2017a): Scientific opinion on bluetongue: control, surveillance and safe movement of animals. *EFSA J.* 15, 4698. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4698.

EFSA AHAW PANEL (EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE), S. MORE, D. BICOUT, A. BØTNER, A. BUTTERWORTH, K. DEPNER, S. EDWARDS, B. GARIN-BASTUJI, M. GOOD, C. GORTÁZAR SCHMIDT, V. MICHEL, M. A. MIRANDA, S. S. NIELSEN, M. RAJ, L. SIHVONEN, H. SPOOLDER, J. A. STEGEMAN, H. H. THULKE, A. VELARDE, P. WILLEBERG, C. WINCKLER, P. MERTENS, G. SAVINI, S. ZIENTARA, A. BROGLIA, F. BALDINELLI, A. GOGIN, L. KOHNLE P. CALISTRI (2017): Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bluetongue. *EFSA J.* 15, 4783. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4783.

EFSA, European Food Safety Authority (2007a): Scientific Report of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on request from the Commission (EFSA-Q-2006-311) and EFSA Self mandate (EFSA-Q-2007-063) on bluetongue. *EFSA J.* 480, 1-20.

ELBERS, A. R. W., A. BACKX, E. MEROCC, G. GERBIER, C. STAUBACH (2008a): Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87, 21–30. doi: 10.1016/j.prevetmed.2008.06.004.

ELBERS, A. R. W., A. BACKX, K. MINTIENS, G. GERBIER, C. STAUBACH, G. HENDRICKX, A. VAN DER SPEK (2008b): Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical

recovery in sheep and cattle in Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87, 31–40. doi: 10.1016/j.prevetmed.2008.06.003.

ELBERS, A. R., R. MEISWINKEL, E. VAN WEEZEP, M. M. VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, E. A. KOOI (2011): Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, *Emerg. Infect. Dis.* 19, 106–109. doi: 10.3201/eid1901.121054.

ERASMUS, B. J. (1975): Bluetongue in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 51, 165–170.

ERASMUS, B. J. (1990): Bluetongue virus. In: *Virus Infections of Ruminants*. (Dinter, Z., B. Morein, Eds.), Elsevier, New York, pp. 227–237.

EVERMANN, J. F. (2008): Accidental introduction of viruses into companion animals by commercial vaccines. *Vet. Clin. N. Am.-small.*, 38, 919–929. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.010.

FILLMORE, G. C., H. LIN, J. K. K. LI (2002): Localization of the single-stranded RNA-binding domains of bluetongue virus nonstructural protein NS2. *J. Virol.* 76, 499–506. doi: 10.1128/jvi.76.2.499-506.2002.

FOXI, C., G. SATTA, G. PUGGIONI, C. LIGIOS (2020): Biting Midges (Ceratopogonidae, *Culicoides*). Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.

GALE, P., T. DREW, L. P. PHIPPS, G. DAVID, M. WOOLDRIDGE (2009): The effect of climate change on the occurrence and prevalence of livestock diseases in Great Britain: a review. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1409–23.

GAMBLES, R. M. (1949): Bluetongue of sheep in Cyprus. *J. Comp. Pathol.* 59, 176–190.

GETHMANN, J., C. PROBST, F. J. CONRATHS (2020): Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. *Front. Vet. Sci.* 7, 65. doi: 10.3389/fvets.2020.00065.

GIOVANNINI, A., P. CALISTRI, A. CONTE, L. SAVINI, D. NANNINI, C. PATTA, U. SANTUCCI, V. CAPORALE (2004): Bluetongue virus surveillance in a newly infected area. *Vet. Ital.* 40, 188–97.

GIOVANNINI, A., S. MACDIARMID, P. CALISTRI, A. CONTE, L. SAVINI, D. NANNINI, S. WEBER (2004): The use of risk assessment to decide the control strategy for bluetongue in Italian ruminant populations. *Risk Anal.* 24, 1737–1753. doi: 10.1111/j.0272-4332.2004.00563.x.

GUIRAKHOO, F., J. A. CATALAN, T. P. MONATH (1995): Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles, *Arch. Virol.* 140, 967–974.

HARDY, W. T., D. A. PRICE (1952): Soremuzzle of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 120, 23–25.

- HARRUP, L. E., G.A. BELLIS, T. BALENGHIEN, C. GARROS (2015): *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infect. Genet. Evol.* 30, 249-266. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.018.
- HARTEMINK, N. A., B. V. PURSE, R. MEISWINKEL, H. E. BROWN, A. DE KOEIJER, A. R. ELBERS, G. J. BOENDER, D. J. ROGERS, J. A. HEESTERBEEK (2009): Mapping the basic reproduction number (R_0) for vector-borne diseases: a case study on bluetongue virus. *Epidemics* 1, 153-161. doi: 10.1016/j.epidem.2009.05.004.
- HASSAN, S. H., C. WIRBILICH, M. FORZAN, P. ROY (2001): Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cellular permeabilization. *J. Virol.* 75, 8356-8367.
- HASSAN, S. S., P. ROY (1999): Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J. Virol.* 73, 9832-9842.
- HEMATI, B, V. CONTRERAS, C. URIEN, M. BONNEAU, H. H. TAKAMATSU, P. P. C. MERTENS, E. BREARD, C. SAILLEAU, S. ZIENTARA, I. SCHWARTZ-CORNIL (2009): Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J. Virol.* 83, 8789-8799.
- HENRICH, M., M. REINACHER, H. P. HAMANN (2007): Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet. Rec.* 161, 764.
- HOFMANN, M. A., S. RENZULLO, M. MADER, V. CHAIGNAT, G. WORWA, B. THUER (2008): Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1855-1861.
- HOFMANN, M., C. GRIOT, V. CHAIGNAT, L. PERLER, B. THÜR (2008): Bluetongue disease reaches Switzerland. [in German] *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 150, 49-56.
- HOWARD, T. H., R. A. BOWEN, B. W. PICKETT (1985): Isolation of bluetongue virus from bull semen. *Prog. Clin. Biol. Res.* 178, 127-134.
- HOWELL, P. G. (1960): A preliminary antigenic classification of strains of bluetongue virus. *Onderstepoort J. S. Afr. vet. med. Ass.* 41, 215-223.
- HUTCHEON, D. (1902): Malarial catarrhal fever of sheep. *Vet. Res.* 14, 629-633.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2022): <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ICTV>
- JAUNIAUX, T. P., K. E. DE CLERQ, D. E. CASSART, S. KENNEDY, F. E. VANDENBUSSCHE, E. L. VANDEMEULEBROUCKE, T. M. VANBINST, B. I. VERHEYDEN, N. E. GORIS, F. L. COIGNOUL (2008): Bluetongue in Eurasian Lynx. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1496-1498.
- JEBARA, K. B., P. CÁCERES, F. BERLINGIERI, L. WEBER-VINTZEL (2012): Ten years' work on the World Organisation for Animal Health (OIE) Worldwide Animal Disease Notification System. *Prev. Vet. Med.* 107, 149-159.

- JENCKEL, M., E. BRÉARD, C. SCHULZ, C. SAILLEAU, C. VIAROUGE, B. HOFFMANN, D. HÖPER, M. BEER, S. ZIENTARA (2015): Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. *Genome Announc.* 3, e00016-15. doi: 10.1128/genomeA.00016-15.
- JOHNSON, D. J., E. N. OSTLUND, D. E. STALLKNECHT, V. H. GOEKJIAN, M. JENKINS-MOORE, S. C. HARRIS (2006): First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a whitetailed deer in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 398–401.
- JUKIĆ, B. (2012.): Tropske zarazne bolesti životinja. U: Veterinarski priručnik, VI. izdanje, Medicinska naklada, 2012.
- KATSOULOS, P. D., N. D. GIADINIS, S. C. CHAINTOUTIS, C. I. DOVAS, E. KIOSSIS, G. TSOUSIS, V. PSYCHAS, I. VLEMMAS, T. PAPADOPOULOS, O. PAPADOPOULOS, S. ZIENTARA, H. KARATZIAS, C. BOSCOS (2016): Epidemiological characteristics and clinicopathological features of bluetongue in sheep and cattle, during the 2014 BTV serotype 4 incursion in Greece. *Trop. Anim. Health. Prod.* 48, 469–477. doi: 10.1007/s11250-015-0974-5.
- KATZ, J., D. ALSTAD, G. GUSTAFSON, J. EVERMANN (1994): Diagnostic Analysis of the Prolonged Bluetongue Virus RNA Presence Found in the Blood of Naturally Infected Cattle and Experimentally Infected Sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 139–142.
- KOUMBATI, M., O. MANGANA, K. NOMIKOU, P. S. MELLOR, O. PAPADOPOULOS (1999): Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 64, 277-85.
- KROSCHEWSKI, K., M. KRAMER, A. MICKLICH, C. STAUBACH, R. CARMANNS, F. J. CONRATHS (2006): Animal disease outbreak control: the use of crisis management tools. *Rev. Sci. Tech.* 25, 211-21.
- KULLDORFF, M., E. J. FEUER, B. A. MILLER, L. S. FREEDMAN (1997): Breast cancer clusters in the northeast United States: a geographic analysis. *Am. J. Epidemiol.* 146, 161–170.
- KULLDORFF, M., W. F. ATHAS, E. J. FEURER, B. A. MILLER, C. R. KEY (1998): Evaluating cluster alarms: a space-time scan statistic and brain cancer in Los Alamos, New Mexico. *Am. J. Public Health.* 88, 1377–1380.
- LEEMANS, J., C. HAMERS, R. CHERY, A. BIBARD, L. BESANCON, M. DUBOEUF, P. HUDELET, S. GOUTEBROZE, N. KIRSCHVINK (2013): Interference of colostral antibodies with response to a Bluetongue serotype 8 inactivated vaccine in lambs born from hyperimmune ewes. *Vaccine*, 31, 1975–1980.
- LEVINGS, R. L., L. A. WILBUR, J. F. EVERMANN, I. R. STOLL, D. E. STARLING, C. A. SPILLERS, G. A. GUSTAFSON, A. J. MCKEIMAN, J. C. RHYAN, D. H. HALVERSON, R. F. ROSENBUSCH (1996): Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *Dev. Biol. Stand.* 88, 219–220.

- LISTEŠ, E., F. MONACO, A. LABROVIĆ, C. PALADINI, A. LEONE, L. DI GIALLEONARDO, C. CAMMA, G. SAVINI (2009): First evidence of bluetongue virus serotype 16 in Croatia. *Vet. Microbiol.* 138, 92-97. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.011.
- LISTEŠ, E., S. BOSNIĆ, M. BENIĆ, J. MADIĆ, Ž. CVETNIĆ, M. LOJKIĆ, S. ŠEPAROVIĆ, A. LABROVIĆ, G. SAVINI (2011): An outbreak of bluetongue virus serotype 9 in southern Croatia. *Acta .Vet. Brno.* 80, 331–336.
- LÓPEZ-OLVERA, J. R., C. FALCONI, P. FERNÁNDEZ-PACHECO, J. FERNÁNDEZ-PINERO, M. A. SÁNCHEZ (2010): Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. *Vet. Microbiol.* 145, 148–152.
- LYSYK, T. J., T. DANYK (2007): Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus. *J. Med. Entomol.* 44, 741–751.
- MAAN, S., N. S. MAAN, K. NOMIKOU, E. VERONESI, K. BACHANEK-BANKOWSKA, M. N. BELAGANAHALLI, H. ATTOUI, P. P. MERTENS (2011): Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS One* 6, e26147. doi: 10.1371/journal.pone.0026147.
- MAAN, S., N. S. MAAN, K. NOMIKOU, S. J. ANTHONY, N. ROSS-SMITH, K. SINGH, A. SAMUEL, A. E. SHAW, P. P. MERTENS (2009): Chapter 7. Molecular epidemiology studies of bluetongue virus. In: *Bluetongue*. (Mellor, P. C., M. Balys, P. P. C. Mertens, Eds.), Elsevier Academic Press, London, pp.135-166.
- MAAN, S., N. S. MAAN, P. A. VAN RIJN, R. G. VAN GENNIP, A. SANDERS, I. M. WRIGHT, C. BATTEN, B. HOFFMANN, M. ESCHBAUMER, C. A. OURA, A. C. POTGIETER, K. NOMIKOU, P. P., MERTENS (2010): Full genome characterisation of bluetongue virus serotype 6 from the Netherlands 2008 and comparison to other field and vaccine strains. *PLoS One* 5, e10323. doi: 10.1371/journal.pone.0010323.
- MACLACHLAN N. J., C. E. MAYO, P. W. DANIELS, G. SAVINI, S. ZIENTARA, E. P. GIBBS (2015): Bluetongue. *Rev. Sci. Tech.* 34, 329-340. doi: 10.20506/rst.34.2.2360.
- MACLACHLAN, N. J. (1994): The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 197-206.
- MACLACHLAN, N. J. (2004): Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet. Ital.* 40, 462–467.
- MACLACHLAN, N. J. (2011): Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev. Vet. Med.* 102, 107–111.
- MACLACHLAN, N. J., C. P. DREW, K. E. DARPEL, G. WORWA (2009): The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.* 141, 1-16. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.04.003.

- MACLACHLAN, N., A. CONLEY, P. KENNEDY (2000): Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 643–651.
- MALESIOS, C., M. CHATZIPANAGIOTOU, N. DEMIRIS, A. KANTARTZIS, G. CHATZILAZAROU, S. CHATZINIKOLAOU, P. KOSTOULAS (2020): A quantitative analysis of the spatial and temporal evolution patterns of the bluetongue virus outbreak in the island of Lesbos, Greece in 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1865-1674. doi: 10.1111/tbed.13553.
- MANSO-RIBEIRO, J., J. ROSA-AZEVEDO, F. NORONHA, M. BRACO-FORTE-JUNIOR, M. VASCO-FERNANDEZ (1957): Fievre catarrhale du mouton (bluetongue). *Bull. Off. Int. Epizoot.* 48, 350-367.
- MAYO, C. E., B. A. MULLENS, W. K. REISEN, C. J. OSBORNE, E. P. J. GIBBS, I. A. GARDNER, N. J. MACLACHLAN (2014): Seasonal and interseasonal dynamics of bluetongue virus infection of dairy cattle and *Culicoides sonorensis* midges in Northern California – Implications for virus overwintering in temperate zones. *PLoS One* 9, e106975. doi: 10.1371/journal.pone.0106975.
- MAYO, C. E., B. M. CROSSLEY, S. K. HIETALA, I. A. GARDNER, R. E. BREITMEYER, N. J. MACLACHLAN (2010): Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 277–281.
- MEHLHORN, H., V. WALLDORF, S. KLIMPEL, B. JAHN, F. JAEGER, J. ESCHWEILER, M. BEER (2007): First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol. Res.* 101, 219–228. doi: 10.1007/s00436-007-0519-6.
- MEISWINKEL, R., G. J. VENTER, E. M. NEVILL (2004): Vectors: *Culicoides* spp. In: *Infectious diseases of livestock.* (Coetzer, J. A. W., R. C. Tustin, Eds.), Oxford University Press, Cape Town, pp. 93–136.
- MELLOR, P. S. (1990): The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 162, 143-161. doi: 10.1007/978-3-642-75247-6_6.
- MELLOR, P. S. (2004): Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Vet. Ital.* 40, 167– 174.
- MELLOR, P. S., E. J. WITTMANN (2002): Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet. J.* 164, 20-37. doi: 10.1053/tvj.2002.0713.
- MELLOR, P. S., G. PITZOLIS (1979.): Observations on breeding sites and light trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bull. Entom. Res.* 69, 229-234.

- MELLOR, P. S., J. BOORMAN, M. BAYLIS (2000): *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 307-340. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.307.
- MELVILLE, L. F., N. T. HUNT, S. S. DAVIS, R. P. WEIR (2004): Bluetongue virus does not persist in naturally infected cattle. *Vet. Ital.* 40, 502-507.
- MENZIES, F. D., S. J. MCCULLOUGH, I. M. MCKEOWN, J. L. FORSTER, S. JESS, C. BATTEN, A. K. MURCHIE, J. GLOSTER, J. G. FALLOWS, W. PELGRIM, P. S. MELLOR, C. A. OURA (2008): Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet. Rec.* 163, 203-209.
- MÉROC, E., C. FAES, C. HERR, B. VERHEYDEN, T. VAN BINST (2008): Establishing the spread of bluetongue virus at the end of the 2006 epidemic in Belgium. *Vet. Microbiol.* 131, 133-144.
- MERTENS, P. P. C., J. DIPROSE (2004): The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus. Res.* 101, 29-43. doi: 10.1016/j.virusres.2003.12.004.
- MERTENS, P. P. C., J. N. BURROUGHS, J. ANDERSON (1987): Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 157, 375-386. doi: 10.1016/0042-6822(87)90280-7.
- MERTENS, P. P. C., P. S. MELLOR (2003): Bluetongue. *State. Vet. J.* 13, 18-25.
- MERTENS, P. P. C., S. MAAN., A. SAMUEL, H. ATTOUI (2005): Orbiviruses. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* (Fauquet, C. M., M. A Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball, Eds.), Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 466-483.
- MEYER, G., C. LACROUX, S. LEGER, S. TOP, K. GOYEAU, M. DEPLANCHE, M. LEMAIRE (2009): Lethal bluetongue virus serotype 1 infection in llamas. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 608-610.
- MURRAY, M. D. (1991): The seasonal abundance of femal biting-midges, *Culicoides brevitarsis* (Diptera, Ceratopogonidae), in coastal south-eastern Australia. *Aust. J. Zool.*, 39, 333-342.
- NEITZ, W.O. (1948): Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Anim. Ind.* 23, 93-136.
- NOMIKOU K, J. HUGHES, R. WASH, P. KELLAM, E. BREARD, S. ZIENTARA, M. PALMARINI, R. BIEK, P. MERTENS (2015b): Widespread reassortment shapes the evolution and epidemiology of bluetongue virus following European invasion. *PLoS Pathog.* 11, e1005056. doi: 10.1371/journal.ppat.1005056.
- NUSINOVICI, S., P. MONESTIEZ, H. SEEGER, F. BEAUDEAU, C. FOURICHON, H. ATTOUI (2014): Using animal performance data to evidence the under-reporting of case herds during an epizootic: application to an outbreak of bluetongue in cattle. *PLoS One*, 9, e100137. doi: 10.1371/journal.pone.0100137.

- ORTIZ-PELAEZ, A., D. U. PFEIFFER, R. J. SOARES-MAGALHÃES, F. J. GUITIAN (2006): Use of social network analysis to characterize the pattern of animal movements in the initial phases of the 2001 foot and mouth disease (FMD) epidemic in the UK. *Prev. Vet. Med.* 76, 40–55.
- OSBORNE, C. J., C. E. MAYO, B. A. MULLENS, E. G. MCDERMOTT, A. C. GERRY, W. K. REISEN, N. J. MACLACHLAN (2015): Lack of evidence for laboratory and natural vertical transmission of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 52, 274-277. doi: 10.1093/jme/tju063.
- OSBURN, B. I. (1994): The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 189-96.
- OURA, C. A., M. EL HARRAK (2011): Midge-transmitted bluetongue in domestic dogs. *Epidemiol. Infect.* 139, 1396-1400. doi: 10.1017/S0950268810002396.
- PARSONSON, I. M. (1990): Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 162, 119-41. doi: 10.1007/978-3-642-75247-6_5.
- PARSONSO, I. M. (1992): Overview of bluetongue virus infection of sheep. In: *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses.* (Walton, T. E., Osburn B. I., Eds.). Proceedings of the 2nd International Symposium, 17-21 June 1991, Paris, France, CRC Press: Boca Raton, pp. 713-724.
- PARSONSON, I. M., A. J. LUEDKE, T. L. BARBER, T. E. WALTON (1994): Bluetongue virus infection in pregnant ewes. *Am. J. Vet. Res.* 55, 666-669.
- PARSONSON, I. M., K. A. MCCOLL (1995): Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen and fixed tissue samples using PCR. *Vet. Microbiol.* 46, 143-149.
- PATTA, C., A. GIOVANNINI, S. ROLESU, D. NANNINI, G. SAVINI, P. CALISTRI, U. SANTUCCI, V. CAPORALE (2004): Bluetongue vaccination in Europe: the Italian experience. *Vet. Ital.* 40, 601-610.
- PERRIN, A., C. CETRE-SOSSAH, B. MATHIEU, T. BALDET, J. C. DELE´COLLE, E. ALBINA (2006): Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rRNA sequences. *Med. Vet. Ent.* 20, 219–228.
- PRASAD, G., D. SREENIVASULU, K. P. SIGH, P. P. C METENS, S. MAAN (2009): Bluetongue in the Indian subcontinent. In: *Bluetongue.* (Mertens, P. P. C., M. Baylis, P. S. Mellor, Eds.), Elsevier Academic Press, London, pp 167–195.
- PUGGIONI, G., D. PINTUS, G. MELONI, A. M. ROCCHIGIANI, D. MANUNTA, G. SAVINI, A. OGGIANO, C. LIGIOS (2016): Persistence of Bluetongue virus serotype 1 virulence in sheep blood refrigerated for 10 years. *Vet. Ital.* 54, 349-353.
- PURSE, B. V., P. S. MELLOR, D. J. ROGERS, A. R. SAMUEL, P. P. MERTENS, M. BAYLIS (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 171-181.

- RAO, P. P., N. R. HEGDE, K. P. SINGH, K. PUTTY, D. HEMADRI, N.S MAAN, P.P.C. MERTENS, (2017): Bluetongue: Aetiology, Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Control. In: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases of Livestock (Bayry, J., Edt.), Springer International Publishing, pp. 3–54. doi:10.1007/978-3-319-47426-7.
- RAWLINGS, P. (1997): A key based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille, Diptera, Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*. 52, 57–71.
- REBOUTZAKOU, H. (1985.): A serological survey for bluetongue in Northern Greece (in Greek, English summary). MSc. Thesis, Aristotle University, Thessaloniki, Greece.
- REOVIRIDAE.ORG (2022): https://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/ReoID/BTV-mol-epidem.htm
- RIEB, J. P. (1982): Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des Cératopogonidés (Diptera, Nematocera). Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles (Diplôme d'Etat), Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- ROBERTS, H., J. SMITH, C. BATTEN, K. NOMIKOU, P. MERTENS (2014): Preliminary outbreak assessment – Bluetongue virus (BTV-4) in Greece, Bulgaria and the Republic of Macedonia. DEFRA. Animal Health & Veterinary Laboratories Agency Veterinary & Science Policy Advice Team - International Disease Monitoring in Eastern Europe. Ref: VITT/1200 BTV.
- ROGERS, D. J., S. E RANDOLPH (2003): Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nature. Rev. Microbiol.* 1, 231–236.
- ROY, P. (1989): Bluetongue virus genetics and genome structures: Review article. *Virus. Res.* 13, 179-206.
- ROY, P. (1996): Orbivirus structure and assembly. *Virology* 216, 1-11.
- RUIZ-FONS, F., A. SÁNCHEZ-MATAMOROS, C. GORTÁZAR, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2014): The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: lessons learned after the natural infection in Spain. *Virus. Res.* 182, 50–58. doi: 10.1016/j.virusres.2013.
- RUSHTON, J., N. LYONS (2015): Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Vet. Ital.* 51, 401-406. doi: 10.12834/VetIt.646.3183.1.
- SAEGERMAN, C., D. BERKVEN, P. S. MELLOR (2008): Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 539-544.
- SAEGERMAN, C., F. REVIRIEGO-GORDEJO, P. P. PASTORET (2008): Bluetongue in northern Europe. OIE, Paris, France, pp. 88.
- SAMINATHAN, M., K. P. SINGH, J. H. KHORAJIYA, M. DINESH, S. VINEETHA, M. MAITY, A. T. FASLU RAHMAN, J. MISRI, Y. SINGH MALIK, V. KUMAR GUPTA, R. KUMAR SINGH, K. DHAMA (2020): An updated review on bluetongue virus:

epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Vet. Q.* 40, 258-321. doi: 10.1080/01652176.2020.1831708.

SAPRE, S. N. (1964):. An outbreak of 'bluetongue' in goats and sheep in Maharashtra state, India. *Vet. Rev.* 15, 69–71.

SAVINI, G., F. MONACO, G. CALZETTA, D. ANTONUCCI, C. CASACCIA, M. TITTARELLI, P. DE SANTIS, A. CONTE, R. LELLI (2001): The 2000 bluetongue (BT) outbreak in Italy. II Clinical, virological and serological responses in sheep and goats following experimental infection with a field isolate of bluetongue virus serotype 2 (BTV-2). 10th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Salsomaggiore, Italy.

SAVINI, G., M. GOFFREDO, F. MONACO, A. DI GENNARO, M. A. CAFIERO, L. BALDI (2005): Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet. Rec.* 157, 133–139.

SCHMAHL, G., H. MEHLHORN, F. ABDEL-GHAFFAR, K. AL-RASHEID, B. SCHUMACHER, A. JATZLAU, H. POHLE (2009b): Does rain reduce the efficacy of Butox 7.5 pour on (deltamethrin) against biting midges (*Culicoides* specimens). *Parasitol. Res.* 105, 1763–1765. doi: 10.1007/s00436-009-1619-2.

SCHMAHL, G., S. KLIMPEL, V. WALLDORF, S. AL-QURAIISHY, B. SCHUMACHER, A. JATZLAU, H. MEHLHORN (2009a): Pilot study on deltamethrin treatment (Butox, Versatrine) of cattle and sheep against midges. *Parasitol. Res.* 104, 809-813. doi: 10.1007/s00436-008-1260-5.

SCHULZ, C., SAILLEAU, E. BRÉARD, J. FLANNERY, C. VIAROUGE, S. ZIENTARA, M. BEER, C. BATTEN, B. HOFFMANN (2017): Experimental infection of sheep, goats and cattle with a bluetongue virus serotype 4 field strain from Bulgaria, 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 243-250. doi: 10.1111/tbed.12746.

SCHWARTZ-CORNIL, I., P. P. MERTENS, V. CONTRERAS, B. HEMATI, F. PASCALE, E. BRÉARD, P. S. MELLOR, N. J. MACLACHLAN, S. ZIENTARA (2008): Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res.* 39, 46. doi: 10.1051/vetres:2008023.

SELLERS, R. F., W. P. TAYLOR (1980): Epidemiology of bluetongue and the import and export of livestock, semen and embryos. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 92, 587–592.

SHIMSHONY, A. (2004): Bluetongue in Israel – a brief historical overview. *Vet Ital.* 40, 116–118.

SPERLOVA, A., D. ZENDULKOVA (2011): Bluetongue: a review. *Vet. Med.* 56, 430–452.

SPREULL, J. (1905): Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J. Comp. Pathol. Ther.* 190, 321–337.

ST GEORGE, T. D., D. H. CYBINSKI, A. J. DELLA-PORTA, D. A. MCPHEE, M. C. WARK, M. H. BAINBRIDGE (1980): The isolation of two bluetongue viruses from healthy cattle in Australia. *Aust. Vet. J.* 56, 562-563. doi: 10.1111/j.1751-0813.1980.tb02598.x.

Suvremena regionalna podjela Republike Hrvatske (IZVOR: Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) : <https://croatia.eu/index.php?view=article&lang=1&id=12>

SZMARAGD, C., A. J. WILSON, S. CARPENTER, J. L. N. WOOD, P. S. MELLOR, S. GUBBINS (2010): The spread of bluetongue virus serotype 8 in Great Britain and its control by vaccination. *PLoS ONE* 5, e9353. doi: 10.1371/journal.pone.0009353.

TALAVERA, S., F. MUÑOZ-MUÑOZ, N. PAGÈS (2011): New insights on diversity, morphology and distribution of *Culicoides Latreille* 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) from Northeast Spain. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 47, 214–231.

TALAVERA, S., F. MUNOZ-MUNOZ, M. DURAN, M. VERDUN, A. SOLER-MEMBRIVES, A. OLEAGA, A. ARENAS, F. RUIZ-FONS, R. ESTRADA, N. PAGES (2015): *Culicoides* species communities associated with wild ruminant ecosystems in Spain: tracking the way to determine potential bridge vectors for arboviruses. *PLoS ONE*, 10, e0141667. doi: 10.1371/journal.pone.0141667.

TAN, B. H., E. NASON, N. STAEUBER, W. JIANG, K. MONASTRYRSKAYA, P. ROY (2001): RGD tripeptide of blue- tongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J. Virol.* 75, 3937–3947.

TAUTZ, D., P. ARCTANDER, A. MINELLI, R. H. THOMAS, A. P. VOGLER (2003): A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18, 70–74.

THEILER, A. (1906): Bluetongue in Sheep. Annual report of the Director of Agriculture, Transvaal. 1904–1905, 110–121.

THEILER, A. (1908): The inoculation of sheep against bluetongue and the results in practice. *Vet. J.*, 64, 600-607.

THIRY, E., C. SAEGERMAN, H. GUYOT, P. KIRTEN, B. LOSSON, F. ROLLIN, M. BODMER, G. CZAPLICKI, J. F. TOUSSAINT, K. DE CLERCQ, J. M. DOCHY, J. DUFÉY, J. L. GILLEMANN, K. MESSEMAN (2006): Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec.* 159, 327. doi: 10.1136/vr.159.10.327.

TOYOMAKI, H., S. SEKIGUCHI, Y. SASAKI, M. SUEYOSHI, K. MAKITA (2018): Factors associated with farm-level infection of porcine epidemic diarrhea during the early phase of the epidemic in Japan in 2013 and 2014. *Prev. Vet. Med.* 150, 77–85. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.12.008.

TWEEDLE, P. S. N., P. S. MELLOR (2002): Technical review – bluetongue: The virus, hosts and vectors. Version 1.5. Report to the Department of Health, Social Services and Public Safety U.K. (DEFRA), pp. 25 p

- VAN DER SLUIJS, M. T. W., A. J. DE SMIT, R. J. M. MOORMANN (2014): Vector independent transmission of the vector-borne bluetongue virus. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 57–64.
- VAN DIJK, A., A. H. HUISMANS (1988): In vitro transcription and translation of bluetongue virus mRNA. *J. Gen. Virol.* 69, 573–581.
- VASILEIOU, N. G. C., G. C. FTHENAKIS, G. S. AMIRIDIS, L. V. ATHANASIOU, P. BIRTSAS, D. C. CHATZOPOULOS, T. M. CHOUZOURIS, A. GIANNAKOPOULOS, K. S. IOANNIDI, S. N. KALONAKI A. I. KATSAFADOU, C. S. KYRIAKIS, V. S. MAVROGIANNI, E. PAPADOPOULOS, V. SPYROU, G. VALIAKOS, A. P. VENIANAKI, C. BILLINIS (2016): Experiences from the 2014 outbreak of bluetongue in Greece. *Small. Rumin. Res.* 142, 61-68. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.02.010.
- VASSALOS, M. (1980): Cas de fièvre catarrhale du mouton dans l'île de Lesbos (Grèce). *Bull. Off. Int. Épiz.*, 92, 547-555.
- VEEPRO HOLLAND, (2021): <https://veepro.nl/animal-health/bluetongue-cattle-sheep-goats/>, preuzeto 20. kolovoza 2021.
- VERONESI, E, G. J. VENTER, K. LABUSCHAGNE, P. S. MELLOR, S. CARPENTER (2009): Life-history parameters of *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer in the laboratory at different rearing temperatures. *Vet. Parasitol.* 163, 370-373. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.04.031.
- VERONESI, E., C. HAMBLIN, P. S. MELLOR (2005): Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopoginidae). *Vaccine* 23, 5509–5516.
- VERONESI, E., K. DARPEL, S. GUBBINS, C. BATTEN, K. NOMIKOU, P. MERTENS, S. CARPENTER (2020): Diversity of transmission outcomes following co-infection of sheep with strains of bluetongue virus serotype 1 and 8. *Microorganisms.* 8, 851. doi: 10.3390/microorganisms8060851.
- VERONESI, E., K. E. DARPEL, C. HAMBLIN, S. CARPENTER, H. H. TAKAMATSU, S. J. ANTHONY, H. ELLIOTT, P. P. MERTENS, P. S. MELLOR (2010): Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4. *Vaccine* 28, 1397–1403. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.107.
- VERWOERD, D. W., B. J. ERASMUS (2004): Bluetongue. In: *Infectious diseases of livestock.* (Coetzer, J. A., R. C. Tustin, Eds.), Oxford University Press, Cape Town, pp. 1201–1230.
- VITANOVSKI, N., D. SOVILJ (2017): Biološki agensi – nečujno oružje oko nas, jesmo li pripravnici. *Policija i sigurnost* 26, 375-385.
- WARD, M. P. (1994): The epidemiology of bluetongue in Australia - a review. *Aust. Vet. J.* 71, 3-7.

- WARD, M. P., T. E. CARPENTER (1997): Simulation analysis of the effect of herd immunity and age structure on infection of a cattle herd with bluetongue viruses in Queensland, Australia. *Prev. Vet. Med.* 29, 299-309. doi: 10.1016/s0167-5877(96)01081-1.
- WELLBY, M. P., M. BAYLIS, P. RAWLINGS, P. S. MELLOR (1996): Effect of temperature of virogenesis of African horse sickness virus in *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its significance in relation to the epidemiology of the disease. *Bull. Entomol. Res.* 86, 715–720.
- WILBUR, L. A., J.F EVERMANN, R. L LEVINGS, I. R. STOLL, D. E. STARLING, C. A. SPILLERS, G. A. GUSTAFSON, A. J. MCKEIRMAN (1994): Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1762-1765.
- WILSON A, P. MELLOR (2008): Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol. Res.* 1, 69-77.
- WILSON, A. J., MELLOR, P. S. (2009): Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2669–2681. doi: 10.1098/rstb.2009.0091.
- WILSON, A., K. DARPEL, P.S. MELLOR (2008): Where Does Bluetongue Virus Sleep in the Winter. *PLoS Biol.* 6, e210. doi: 10.1371/journal.pbio.0060210.
- WITTMANN, E. J., M. BAYLIS (2000): Climate change: Effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. *Vet. J.* 160, 107-117.
- WITTMANN, E. J., P. S. MELLO, M. BAYLIS (2002): Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med. Vet. Entomol.* Jun.16, 147-56.
- WOUDA, W., N. H. PEPPERKAMP, M. P. ROUMEN, J. MUSKENS, A. VAN RIJN, P. VELLEMA (2009): Epizootic congenital hydranencephaly and abortion in cattle due to bluetongue virus serotype 8 in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd.* 134, 422-427.

10. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Ivana Lohman Jaković, dr. med. vet., rođena je 12. lipnja 1978. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Slavonskom Brodu i Zagrebu, a na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 2004. godine. Od 2005. godine zaposlena je u Ministarstvu poljoprivrede, Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane na poslovima vezanim uz zaštitu zdravlja i dobrobiti životinja. Dugi niz godina djeluje kao voditelj ili ekspert u području zdravlja životinja na međunarodnim projektima institucionalne pomoći EU namijenjenih zemljama u pristupaju Europskoj uniji. Sudjelovala je na brojnim stručnim i znanstvenim supovima u zemlji i inozemstvu u svojstvu predavača i sudionika te bila autor ili koautor niza stručnih i znanstvenih članaka.

U svom radu primarni interes ima za epidemiologiju, strateško planiranje i upravljanje krizama u području zdravlja životinja, zoonoze i vektorske zarazne bolesti životinja.

POPIS RADOVA

Knjige i poglavlja u knjigama (Autorske knjige)

Prukner-Radovčić, Estella; Pem Novosel, Iva; Lohman Janković, Ivana; Špičić, Silvio; Hengl, Brigita; Kiš, Tomislav; Knežević, Dražen
Godišnje izvješće o zoonozama u Hrvatskoj za 2014. godinu.. Osijek: Hrvatska agencija za hranu (HAH), 2016 (Izvješće). (<https://www.bib.irb.hr/908192>)

Radovi u časopisima (Znanstveni i pregledni radovi)

Bedeković, Tomislav; Lohman Janković, Ivana; Šimić, Ivana; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Sućec, Ivica; Robardet, Emmanuelle; Cliquet, Florence; Control and elimination of rabies in Croatia. (Nancy OIE/WHO/EU Laboratory for Rabies and Wildlife, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Malzéville, France) // PLoS One, 13 (2018), 9; 1-14 doi:10.1371/journal.pone.0204115

Beck, Relja; Mihaljević, Željko; Brezak, Renata; Bosnić, Sanja; Lohman Janković, Ivana; Deplazes, Peter First detection of Echinococcus multilocularis in Croatia. Parasitol Res. 2018 Feb;117(2):617-621. doi: 10.1007/s00436-017-5732-3. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29280073.

Vodopija, Radovan; Sokol, Kruno; Lohman Janković, I.; Sućec, Ivica; Oralna vakcinacija lisica protiv bjesnoće u Republici Hrvatskoj - koliko smo uspješni do sada?. // Infektološki glasnik, 36 (2016), 1; 17-26. (<https://www.bib.irb.hr/917195>)

Bedeković, Tomislav; Šimić, Ivana; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Mihaljević, Željko; Sućec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Hostnik, Peter ; Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. // BMC Veterinary Research, 12 (2016), 76; 1-7 doi:10.1186/s12917-016-0701-0

Balić, Davor; Lohman Janković, Ivana; Roić, Besi; Lojkić, Ivana; Madić, Josip; Periškić, Marin; Škrivanko, Mario; Lolić, Marica; Agičić, Marija; Rasprostranjenost enzootske leukoze goveda u Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2011. s osvrtom na probleme suzbijanja i iskorjenjivanja. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 44 (2013), 4; 261-272

Barbić, Ljubo; Stevanović, Vladimir; Kovač, Snježana; Maltar, Ljupka; Lohman Janković, Ivana; Vilibić-Čavlek, Tatjana; Madić, Josip; West Nile virus serosurveillance in horses in Croatia during the 2012 transmission season. // Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti, 39 (2013), 95-104

Špičić, Silvio; Vujnović, Anja; Račić, Ivana; Zdelar Tuk, Maja; Duvnjak, Sanja; Lohman Janković, Ivana; Kiš, Tomislav; Cvetnić, Željko; Leptospiroza ovnova i jarčeva u Hrvatskoj. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 44 (2013), 1; 11-17

Sukalić, Tomislav; Končurat, Ana; Pavljak, Ivica; Jurmanović, Jadranka; Lohman Janković, Ivana; Bakteriološke metode detekcije *Listeria* spp. i prevalencija *Listeria monocytogenes* iz uzoraka dostavljenih po pobačaju domaćih papkara u razdoblju 2008. - 2016. // Zbornik radova 6. Hrvatskog Veterinarskog Kongresa sa međunarodnim sudjelovanjem / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora i Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2016. str. 219-22

Stručni radovi

Bedeković, Tomislav; Šimić, Ivana; Lojkić, Ivana; Deždek, Danko; Krešić, Nina; Sućec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Madić, Josip; Cvetnić, Željko; Infekcija virusom sindroma smeđeg zeca. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 45 (2014), 1; 37-40

Jemeršić, Lorena; Cvetnić, Željko; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav; Lohman Janković, Ivana Bolest kvrgave kože - egzotična zaraza goveda koja kuca i na naša vrata. // Mljekarski list, 53 (2016), 07; 53-55

Drugi radovi u časopisima

Barbić, Ljubo; Stevanović, Vladimir; Milas, Zoran; Starešina, Vilim; Turk, Nenad; Štritof Majetić, Zrinka; Habuš, Josipa; Perharić, Matko; Kovač, Snježana; Martinković, Krešimir et al.; Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj - značaj i rezultati veterinarske kontrole u javnom zdravstvu. // Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora, 22 (2014), 1-2; 24-31

Radovi u postupku objavljivanja

Beck, Relja; Bosnić, Sanja; Brezak, Renata; Šarić, Tomislav; Kostelić, Antun; Lohman Janković, Ivana Krpelji Dalmacije i njihov vektorski potencijal. // Zbornik radova 6. Hrvatskog Veterinarskog Kongresa sa međunarodnim sudjelovanjem / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Tiskara Zelina d.d., 2016. str. 299-304

Pavlak, Marina; Tadić, Marinela; Stevanović, Vlado; Lohman Janković, Ivana; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav; Sućec, Ivica; Barbić, Ljubo Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of equine viral arteritis. // Proceedings 14th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics / ISVEE Committee (ur.). Merida, 2015. str. 230-230

Šimpraga, Borka; Lohman-Janković, Ivana; Krstulović, Fani; Sokolović, Marijana; Labrović, Ankica; Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti bakterija *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* izdvojenih iz tovnih pilića. // Peradarski dani 2011. / Balenović, Mirta (ur.). Zagreb: Centar za peradarstvo, Zagreb, 2011. str. 108-113

Sažeci sa skupova (Sažeci u zbornicima i časopisima)

Barbić, Ljubo; Stevanović, Vladimir; Vilibić Čavlek Tatjana; Kovač, Snježana; Pem Novosel, Iva; Kaić, Bernard; Listeš, Eddy; Maltar, Ljupka; Lohman Janković, Ivana; Starešina, Vilim
Serosurveillance of WNV in horses – useful tool for public health. // Final Programme
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - 24th ECCMID /
ESCMID (ur.). Barcelona: ECCMID, 2014. str. 153-153

Barbić, Ljubo; Stevanović, Vladimir; Kovač, Snježana; Listeš, Eddy; Maltar, Ljupka; Lohman
Janković, Ivana: West Nile Virus Serosurveillance in Horses - a Early Warning Model for
Human Clinical Cases. // 31st World Veterinary Congress, Proceedings & Abstracts / World
Veterinary Association (ur.). Prag, Češka: World Veterinary Association, 2013.

Horvatek Tomić, Danijela; Lohman Janković, Ivana; Prukner-Radovčić, Estella; Bakterije roda
Campylobacter spp. u primarnoj proizvodnji peradi u Republici Hrvatskoj. // Knjiga sažetaka
Zagreb, Hrvatska, 2011.