

# Utvrđivanje epizootičkog značenja i unaprjeđenje dijagnostike virusnog arteritisa konja na području Republike Hrvatske

---

Maltar, Ljupka

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:178:096571>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Ljupka Maltar, dr. med. vet

**Utvrđivanje epizootiološkog značenja i  
unaprjeđenje dijagnostike virusnog arteritisa  
konja na području Republike Hrvatske**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.





University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ljupka Maltar, DVM

**DETERMINING THE EPIZOOTIOLOGICAL  
SIGNIFICANCE AND IMPROVING THE  
DIAGNOSTICS OF EQUINE VIRAL ARTERITIS IN  
THE REPUBLIC OF CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022.





Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

Ljupka Maltar, dr. med. vet.

**Utvrđivanje epizootiološkog značenja i  
unaprjeđenje dijagnostike virusnog arteritisa  
konja na području Republike Hrvatske**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Ljubo Barbić  
dr. sc. Miroslav Benić

Zagreb, 2022.





University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ljupka Maltar, DVM

**DETERMINING THE EPIZOOTIOLOGICAL  
SIGNIFICANCE AND IMPROVING THE  
DIAGNOSTICS OF EQUINE VIRAL ARTERITIS IN  
THE REPUBLIC OF CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ljubo Barbić, DVM, PhD, Full Professor  
Miroslav Benić, DVM, PhD

Zagreb, 2022.








Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, Ljupka Maltar, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.



Zagreb, 2022.



## *Zahvale*

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima jer me bezuvjetno podržavaju na mom profesionalnom i životnom putu. Ovo je moj poklon vama.

Velika zahvala mentoru prof. dr. sc. Ljubi Barbiću koji me je vodio, usmjeravao i pomagao pri izradi ove doktorske disertacije. Hvala, jer sam imala priliku učiti i napredovati i ostvariti svoju veliku želju.

Hvala dr. sc. Miroslavu Beniću koji mi je pomogao pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem prijateljima i suradnicima na pomoći i podršci tijekom izazovnog vremena pisanja radnje i pomaganju u malim ali jako važnim elementima ka konačnom cilju.

Leo, znam da si mislio na mene i da si se trudio pomoći. To je divan osjećaj koji me pratio i još ga osjećam i čini me jačom i sretnijom.

Posebno želim zahvaliti suprugu, mojoj djeci Lorni i Lovri na razumijevanju, pomoći u svakodnevnim zadacima i podršci koju sam imala, samo da bih ja mogla nesmetano pisati. Znam da im nije uvijek bilo jednostavno ali veselili su se svakom napretku i mojem zadovoljstvu. Vi ste moja sreća i moja ljubav.

## SAŽETAK

Virusni arteritis konja (VAK) je zarazna bolest kopitara proširena diljem svijeta koja se očituje različitim kliničkim oblicima koji variraju od subkliničkog do teških respiratornih infekcija s mogućim smrtnim ishodima u ždrebadi. Uz to virus virusnog arteritisa konja (EAV) smatra se jednim od najznačajnijih uzročnika pobačaja u konja što bolesti daje izniman gospodarski i uzgojni značaj. Prvi dokaz cirkulacije EAV na području Republike Hrvatske (RH) datira iz 2005. godine, a od 2009. godine je propisano obvezno nadziranje i suzbijanje bolesti.

Kako bi se istražila uspješnost mjera nadzora te odredile epizootiološke značajke VAK na području RH, u istraživanju je određivano kretanje seroprevalencije infekcija u prvih šest godina provođenja nadzora. Istražena je i mogućnost provođenja serološke dijagnostike komercijalnim imunoenzimnim kompletima (ELISA) te molekularna epizootiologija VAK na području RH. U tu svrhu analizirani su podaci serološkog pretraživanja 4445 konja s područja RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine. Uz to 94 seruma konja su usporedno pretražena virus neutralizacijskim testom (VN-test) te s dva komercijalno dostupna ELISA kompleta. Načinjena je i filogenetska analiza 16 EAV dokazanih na području RH.

Rezultati su potvrdili značajno smanjenje seroprevalencije u istraživanom razdoblju tako da je svake slijedeće godine vjerojatnost za serološki pozitivan nalaz bila značajno manja (OR=0,77, 95% CI 0,7-0,84,  $p<0,001$ ). Ustanovljeno je da je cirkulacija EAV najizraženija u Istočnoj Hrvatskoj (OR=1,82, 95% CI 1,62-2,06,  $p<0,001$ ) te da su infekcije češće u ženskih životinja (OR=1,96, 95% CI 1,44-2,68,  $p<0,001$ ). Uz navedeno najznačajniji čimbenik rizika je viša životna dob, posebno u skupini životinja iznad deset

godina (OR=16,53, 95% CI 10,6-26,65,  $p<0,001$ ), a infekcije su najčešće u konja lipicanske pasmine (OR=6,46, 95% CI 4,17-10,31,  $p<0,001$ ). Kroz kretanje seroprevalencije u istraživanom razdoblju, osim stalnog prisustva uzročnika, dokazane su i neprijavljene epizootije u Istočnoj i Središnjoj Hrvatskoj s različitim epizootiološkim značajkama, najvjerojatnije uvjetovane pasminskom strukturom te načinom držanja i korištenja konja. Također je dokazano da se za serološko pretraživanje konja na VAK može koristiti određeni komercijalni ELISA komplet ali samo nakon validacije u lokalnim epizootiološkim prilikama. Molekularnom tipizacijom EAV dokazanih na području RH potvrđena je kocirkulacija najmanje dva soja EAV od kojih je jedan u skladu s globalnom cirkulacijom virusnih sojeva dok drugi ima neovisnu evoluciju i predstavlja soj prisutan više desetljeća lokalno na prostoru RH i susjednih država.

Cjelokupnim rezultatima istraživanja potvrđena je opravdanost uvođenja nadzora VAK na području RH kao i učinkovita usmjerenost propisanih mjera te optimalan odabir serološke dijagnostičke metode u njihovoj provedbi. Dokaz nepotpunosti i nedosljednosti provođenja mjera nadzora i suzbijanja, uz istovremeno stalno prisustvo EAV u populaciji konja RH te kocirkulaciju različitih sojeva EAV, naglašava nužnost kontinuiteta provođenja mjera. Temeljem analize čimbenika rizika posebno intenzivne mjere moraju biti u konja lipicanske pasmine u Istočnoj Hrvatskoj. Navedenim se može jamčiti očuvanje zdravlja životinja i uspješna provedba uzgojnih programa. Ovo je temeljni preduvjet za daljnji razvoj konjogojstva RH, ali i očuvanje nacionalne baštine koju predstavlja uzgoj hrvatskih autohtonih pasmina konja.

**Ključne riječi:** virusni arteritis konja, mjere nadzora, čimbenici rizika, dijagnostika, molekularna epizootiologija

# **EXTENDED ABSTRACT**

## **Introduction**

Equine viral arteritis (EVA) is one of the most important equine viral diseases both because of the clinical presentation of the disease and as one of the single most important causes of abortion in mares. Despite the global widespread distribution of the disease, the first evidence of the equine viral arteritis virus (EAV) circulation in the Republic of Croatia was confirmed in 2005. The confirmation of positive animals in different parts of Croatia in 2008 led to the introduction of mandatory disease control measures in 2009, which have been in place ever since. For disease control purposes, the frequent asymptomatic infections that are dominant among the carrier stallions who can remain lifelong virus carriers, have been the biggest challenge. Therefore, the control measures are based on the serological testing of animals and the exclusion of carrier stallions from the breeding programme. In line with the recommendation of the World Organisation for Animal Health (OIE), serological diagnostics is based on the virus neutralisation test (VN-test). As this method is very demanding in practice, sometimes the enzyme-linked immunoassay (ELISA) is used as an alternative. However, the reliability of the use of the ELISA method has to be assessed against the area-specific individual epizootiological situation. The epizootiological characteristics of the EVA in an area depend on the breed structure, the methods of keeping and use of horses, as well as the circulating virus strains, which will ultimately determine the clinical presentation of the disease. In Croatia, horse-breeding is characterised by the indigenous horse breeding programmes, with the most dominant being the coldblooded breeds such as the Croatian Posavina horse and the Croatian Coldblood horse, which are mostly bred in Central Croatia and often by using extensive farming methods; and the lipizzaner horse, which is the most widely bred horse

breed in Eastern Croatia. An analysis of these two biggest groups of horses already clearly shows that their respective epizootiological characteristics are mutually very different. Additionally, we also have to take into account the growing population of warmblood horses, which are kept for sports and leisure, and have a different set of epizootiological characteristics.

The epizootiological characteristics of the EVA have not been examined in detail in Croatia so far, and neither has been evaluated the effect of the mandatory measures despite the fact that they have been implemented for more than a decade. Furthermore, the diagnostic potential of the commercial ELISA assays in our epizootiological situation has not been sufficiently examined and no molecular typing of the circulating EAV strains has been carried out to the present day. These existing gaps, in addition to the fact that the disease is present in Croatia, were the main reasons that lead to this survey with the aim of investigating of the epizootiological situation, determining the risk factors, evaluating the effectiveness of the mandatory control measures, examining the serological diagnostic alternatives and expanding the knowledge with respect to the EVA molecular epizootiology; all against the backdrop of the specific epizootiological features of the horse breeding in Croatia.

## **Methods**

In order to achieve the objectives of this study, the test results for a total number of 4445 horses from across the Croatian territory that had been serologically tested by VN-test in the period 2010-2015, were analysed. For each individual sample, the analysis included the year of sampling, the area where the tested animal was kept, the breed, age, sex and category of the animal, as well as VN-test result. Based on the above, the seroprevalence



was established for the reference period, as well as for each individual year that fell within the temporal scope of the survey at the level of the entire country and then at the level of the three individual regions (Eastern, Central and Coastal Croatia). These regions were selected for the survey based on the grouping of the counties with similar epizootiological situations, so as to obtain a satisfactory sample for determining the risk factors. Due to an imbalanced sample, such an analysis could not be conducted at the county level. The data that were thus grouped were then analysed to determine the differences and risk factors in relation to the region, age, sex, gender, category and the year covered by the survey. All data were statistically processed to determine the significance of the obtained result and the risk factors and their significance were determined by establishing the odds ratio with a confidence interval of 95% and  $p < 0.05$ . Additionally, the correlation was determined by using the Pearson correlation coefficient ( $r$ ) and the results were shown as  $r$  and a confidence interval of 95%. A logistic regression analysis was also carried out, as well as an analysis of the relative significance of individual factors in the outcome of the VN-test.

With the aim of analysing the possibilities of using commercial ELISA test kits for the serological diagnostic purposes, 94 horses were tested using VN test and two commercial immunoenzyme tests: ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (ID.Vet, Grabels, France) and INgezim Arteritis 2.0 (Eurofins Technologies Ingenasa, Madrid, Spain). The sensitivity and specificity, as well as the reliability of the commercial ELISA tests, were determined by comparing the test results.

A total of 16 archived RNAs isolated from the viruses confirmed in the Osijek-Baranja County and the Brod-Posavina County were used for the molecular epizootiology examination. For molecular typing, the nucleotide sequences of the EAV ORF5 gene

were analysed. After the successful multiplication of the ORF 5 gene confirmed by gel electrophoresis, the nucleotide sequences were determined in Macrogen Europe (Amsterdam, the Netherlands) and obtained sequences were phylogenetically compared with the 138 nucleotide sequences of the same EAV gene isolated in the world with the known year and country of isolation, and which were freely available in the gene bank (GenBank).

## **Results**

The seroprevalence in the territory of Croatia decreased from 21.3% to 9.7% in the 2010-2015 period. It was demonstrated that with every successive year, the odds of infection for horses was 0.77 lower (OR=0,77, 95% CI 0,7-0,84,  $p<0,001$ ). Eastern Croatia is the area with the statistically significantly higher seroprevalence of EAV infections and there is a high correlation between the seroprevalence in this area and the seroprevalence at the level of Croatia ( $r=0.86$ ; 95% CI=0.16-0.98;  $p=0.03$ ). The same was demonstrated for the seroprevalence of stallions in the same region ( $r=0.88$ ; CI 95% 0.22-0.99;  $p=0.02$ ). Among the risk factors, the most impactful on the seropositivity throughout the period is the rising age of the animal so that, when compared to the animals below five years of age, the probability of the positive result increases by factor 3.99 in animals aged 5-10 years (OR=3,99, 95% CI 2,55-6,43,  $p<0,001$ ), and by as much as factor 16.5 in animals older than 10 years (OR=16,53, 95% CI 10,6-26,65,  $p<0,001$ ). Female animals are 1.96 more likely to have a positive test result (OR=1,96, 95% CI 1,44-2,68,  $p<0,001$ ), as well as the horses of lipizzaner breed, who are 6.46 times more often positive than other warmblood horses (OR=6,46, 95% CI 4,17-10,31,  $p<0,001$ ).

The scope of application of the mandatory control measures were from 60.3% to 91.5% at the level of the breeding animals, and from 18.6% to 23.6% at the level of the general animal population. In addition, incomplete epizootiological data was present in 23.9-45.9% of the cover letters received with the laboratory sample.

Serological diagnosis of EVA monitoring in the equine population in the Republic of Croatia can be carried out with specific ELISA tests but only after validation in local epizootic conditions.

The phylogenetic analysis confirmed a close link between the EAV strains isolated in the territory of the Osijek-Baranja County and they belong to the EU-1 virus group. The strains confirmed in the territory of the Slavonski Brod-Posavina County were mutually matching and phylogenetically distant from the strains found in the Osijek-Baranja County. These viruses, together with the strain isolated in the Republic of Serbia and the strain isolated in the United States in 1963, form a separate branch on the phylogenetic tree.

## **Conclusions**

Equine viral arteritis is widespread across the Republic of Croatia with the highest seroprevalence in Eastern Croatia. After the introduction of the mandatory control measures, the seroprevalence has been continuously decreasing, and an even better result could be achieved by the full implementation of the mandatory measures. The most significant risk factor is the increasing age of the animal, and female animals are more often positive than male animals. In addition, the infections are significantly more frequent in horses of lipizzaner breed. Seroprevalence results analysis indicate two

previously unreported epizootics of the EVA in Central and Eastern Croatia, which additionally emphasises the deficiency in mandatory measures conducting.

In the serological diagnostics of EVA, the method of choice can be ELISA tests but only after validation in local epizootic conditions. Although the ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect test has a higher matching rate of results in terms of routine laboratory diagnostics, it is not acceptable due to the potential false-negative results.

In view of all of the above, and the proven co-circulation of at least two different virus strains of EAV in Croatia, it is necessary to continue the implementation of the control measures to the fullest extent, placing an additional emphasis on the lippizaner horse populations in Eastern Croatia in order to successfully control and eradicate this disease that has a significant impact, both economically and in terms of the breeding programmes. This is the only way to ensure the future development of the horsebreeding in Croatia and protect the national heritage that is the Croatian indigenous breeds.

## SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA .....	6
2.1.	Povijest.....	6
2.2.	Zemljopisna proširenost .....	8
2.3.	Etiologija .....	11
2.3.1.	Klasifikacija i taksonomija virusa VAK.....	11
2.4.	Epizootiologija .....	14
2.5.	Klinička slika .....	17
2.6.	Patogeneza .....	21
2.7.	Imunološki odgovor domaćina.....	24
2.8.	Dijagnostika.....	27
2.8.1.	Metode dijagnostike VAK dokazom uzročnika ili njegove nukleinske kiseline .....	29
2.8.1.1.	Izdvajanje uzročnika na staničnoj kulturi .....	30
2.8.1.2.	Izdvajanje virusa iz sjemena i dokaz kliconoštva .....	31
2.8.2.	Molekularne metode dijagnostike.....	34
2.8.3.	Serološke metode dijagnostike.....	36
2.8.3.1.	Virus neutralizacijski test.....	36
2.8.3.2.	Imunoenzimni test (ELISA) .....	37
2.9.	Liječenje .....	39
2.10.	Cijepljenje .....	40
2.11.	Mjere kontrole i iskorjenjivanja VAK-a.....	41
2.11.1.	Mjere kontrole u Republici Hrvatskoj .....	45
3.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	50
4.	MATERIJAL I METODE.....	53

4.1 Arhivski podaci o serološkom pretraživanju konja na virusni arteritis konja .....	53
4.2. Statistička analiza epizootioloških značajki VAK na području RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine .....	62
4.3. Procjena opsega i kvalitete provođenja mjera nadzora VAK na području RH .....	63
4.4. Usporedba rezultata serološkog pretraživanja komercijalnim imunoenzimnim testovima i VN-testom .....	64
4.4.1. Arhivski uzorci seruma pretraživani VN-testom i komercijalnim imunoenzimnim testovima .....	64
4.4.2. Izvođenje serološke metode virus neutralizirajućeg testa (VN-test) .....	65
4.4.3. Pretraživanje arhivskih seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testovima.....	76
4.4.4. Postupak serološkog pretraživanja seruma konja na VAK korištenjem komercijalne ELISA-e ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect.....	79
4.4.5. Postupak serološkog pretraživanja seruma konja na VAK korištenjem komercijalne ELISA-e Ingezim Arteritis 2.0.....	83
4.4.6. Određivanje podudarnosti rezultata pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK korištenjem različitih seroloških metoda.....	87
4.5. Arhivski uzorci RNK virusa VAK.....	87
4.5.1. Lančana reakcija polimerazom s prethodnim prepisivanjem (RT-PCR) .....	88
4.5.2. RT-PCR za umnažanje virusne RNK .....	90
4.5.3. Umnažanje cDNK ORF 5 gena virusa VAK.....	92
4.5.4. Određivanje nukleotidnih sljedova ORF 5 gena EAV dokazanih na području RH i filogenetska analiza .....	96
5. REZULTATI.....	98
5.1. Seroprevalencija VAK na području RH i na razini županija u razdoblju od 2010. do 2015. godine .....	98
5.2. Seroprevalencija VAK u regijama RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine .....	101
5.3. Seroprevalencija VAK ovisno o dobi i regijama pretraženih životinja .....	107
5.4. Seroprevalencija VAK prema spolu i regijama pretraženih životinja .....	114
5.5. Seroprevalencija VAK prema kategoriji i regijama pretraženih životinja .....	118
5.6. Seroprevalencija VAK prema pasminama i regijama pretraženih životinja .....	126

5.7. Logistička regresija i utjecaj čimbenika rizika na seropozitivitet .....	131
5.8. Analiza opsega provođenja mjera nadziranja i suzbijanja VAK na području RH u promatranom razdoblju .....	133
5.8.1. Navođenje epizootioloških značajki o pretraživanim životinjama na popratnim obrascima uz dostavljene uzorke .....	136
5.9. Rezultati serološkog pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK.....	137
5.9.1. Pretraživanje arhivskih uzoraka seruma VN-testom .....	137
5.9.2. Rezultati pretraživanja arhivskih uzoraka seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testom ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect .....	138
5.9.3. Rezultati pretraživanja arhivskih uzoraka seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testom Ingezim Arteritis 2.0 .....	142
5.9.4. Rezultati određivanja podudarnosti između korištenih testova za serološko pretraživanje na VAK arhivskih uzoraka seruma.....	143
5.10. Arhivski uzorci RNK virusa VAK .....	145
5.10.1. Lančana reakcija polimerazom za određivanje nukleotidnih sljedova ORF 5 gena EAV izdvojenih na području RH .....	145
5.10.2. Filogenetska analiza virusa VAK izdvojenih na području RH temeljem nukleotidnih sljedova ORF 5 gena.....	148
6. RASPRAVA .....	150
7. ZAKLJUČCI .....	165
8. POPIS LITERATURE .....	166
9. PRILOZI.....	193
9.1. Popis slika .....	193
9.2. Popis tablica .....	195
9.3. Popis kratica .....	197
10. Životopis autora i popis objavljenih znanstvenih radova .....	200
10.1. Životopis .....	200
10.2. Popis radova .....	201

## 1. UVOD

Virusni arteritis konja (VAK) je zarazna bolest kopitara na koju su prijemljivi svi pripadnici porodice *Equidae* uključujući konje, magarce, mazge, mule i zebre (BALASURIYA i sur., 2016.). Bolest uzrokuje virus virusnog arteritisa konja (EAV) koji pripada rodu *Alphaarterivirus* (ICTV, 2021.), porodici *Arteriviridae*, red *Nidovirales* (SURMA-KURUSIEWICZ i sur., 2013.; PAYNE, 2017.).

Bolest je proširena diljem svijeta, uzrokujući gospodarske i uzgojne gubitke prvenstveno zbog pobačaja kao i respiratornih kliničkih oblika, zbog čega ju je Svjetska organizacija za zdravlje životinja (*franc. Office international des epizooties* - OIE) i stavila na listu bolesti koje podliježu obveznom prijavljivanju (OIE, 2018.). Proširenost bolesti značajno varira u različitim državama, kao i na različitim epizootiološkim područjima unutar njih. Prema službenim podacima Svjetske organizacije za zdravlje životinja od 2005. godine do danas VAK je dijagnosticiran i u pojedinim državama koje graniče s Republikom Hrvatskom (RH) s izuzetkom Crne Gore i Bosne i Hercegovine, dok je u Republici Srbiji, bolest prijavljena OIE-u samo tijekom 2017. godine i to vjerojatno temeljem znanstvenog rada u kojem se navodi cirkulacija EAV na području Vojvodine (LAZIĆ i sur., 2017.), a molekularnom tipizacijom potvrđena je cirkulacija EAV europske podgrupe 2 (GAUDAIRE i sur., 2019.). Važno je istaknuti da podaci o prijavama pozitivnih slučajeva bolesti OIE-u znatno variraju prvenstveno zbog nacionalnih propisa koji na različite načine određuju prevenciju, kontrolu te iskorjenjivanje ove bolesti.

Na području RH prvi podaci o prisustvu VAK opisani su 2009. godine kada je pretraživanjem arhivskih uzoraka seruma sportskih konja, uzorkovanih tijekom 2005.



godine, ustanovljena seroprevalencija od 9% u sportskih konja na Hipodromu Zagreb (BARBIĆ i sur., 2009.). Sustavna kontrola ove gospodarski i uzgojno značajne bolesti kopitara na području RH uvedena je od 2009. godine sukladno nacionalnim propisima i propisima na razini Europske unije (EU) (ANONIMNO, 2009.a; ANONIMNO, 2009.b; ANONIMNO, 2009.c.; ANONIMNO, 2009.d; ANONIMNO, 2009.e; ANONIMNO, 2009.f).

Uzročnik VAK je ovijeni, kuglasti virus, veličine 50-74 nm (ICTV, 2021.) s jednostrukom pozitivno orijentiranom ribonukleinskom kiselinom (RNK). Duljina genoma varira ovisno o soju virusa i sadržava najmanje deset otvorenih okvira čitanja (*engl.* open reading frame - ORF). Najvarijabilniji dijelovi genoma su ORF3 i ORF5 koji kodiraju glikoproteine ovojnice GP3 i GP5 (STADEJEK i sur., 1999.; ZHANG i sur. 2010.; MISZCZAK i sur., 2012.). S obzirom na navedeno, u istraživanjima iz područja molekularne epizootologije za određivanje nukleotidnog slijeda najčešće se koriste dijelovi genoma ORF3 i ORF5. Virus virusnog arteritisa konja je serološki jedinstven, ali prema genskoj varijabilnosti svrstava se u sjeverno američke i europske sojeve koji se dijele u europsku podgrupu 1 i europsku podgrupu 2. Ova genska heterolognost je značajna jer je dokazano da se klinički ishod infekcije razlikuje ovisno, među ostalim, i o soju virusa (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA i sur., 2013.). Najkonzerviraniji dio genoma je ORF7 na koji je usmjerena molekularna dijagnostika bolesti (LU i sur. 2008.; MISZCZAK i sur., 2011.) Tijekom perzistentne infekcije pastuha dolazi do genskih izmjena virusa u životinji što dovodi do nastanka genski i fenotipski različitih virusnih varijanti, tzv. kvazivrsta (BALASURIYA i sur., 2004.) zbog čega je značajno provoditi molekularnu tipizaciju cirkulirajućih sojeva na određenom području u svrhu poznavanja lokalne epizootologije bolesti i optimizacije molekularne dijagnostike.

Od VAK oboljevaju sve vrste kopitara svih dobnih skupina, ali je značajno viša seroprevalencija utvrđena u starijih životinja što se pripisuje učestalijoj izloženosti (HULLINGER i sur., 1998.). Uočena je i pasminska dispozicija koja može biti posljedica načina uzgoja, korištenja životinje, ali i genske dispozicije na infekciju i razvoj trajnog kliconoštva (GO i sur., 2011.b). U središtu epizootologije VAK su pastusi koji nakon infekcije mogu postati privremeni ili trajni kliconoše u slučaju čega uzročnik može trajno ostati u spolnom sustavu pastuha u najvećoj koncentraciji u proširenju sjemenovoda te se izlučivati ejakulatom (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). Međutim, poteškoće u nadzoru širenja bolesti predstavlja činjenica da izlučivanje može biti povremeno ili stalno te se radi potvrde ili isključenja kliconoštva mora pretražiti najmanje dva ejakulata serološki pozitivnih pastuha. Mehanizam nastanka kliconoštva nije do kraja razjašnjen, ali najvjerojatnije je ovisan o testosteronu (MCCOLLUM i sur., 1994.). Najznačajniji način širenja bolesti je koitus pastuha kliconoša i prijemljivih kobila (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Bolest se uz navedeni najčešći način širenja tijekom koitusa, može prenositi izravnim dodirrom s akutno oboljelim životinjom bilo koje kategorije koja izlučuje velike količine virusa tijekom prvih 7–14 dana bolesti (MCCOLLUM i sur., 1971.). Osim u pastuha kliconoša u svih ostalih kategorija 28 dana nakon infekcije više nije moguće dokazati izlučivanje uzročnika (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Širenje bolesti također je opisano i putem aerosola urina, kao i drugih tjelesnih tekućina akutno inficiranih životinja te tijekom boravka u kontaminiranoj okolini (GLASER i sur., 1996.; GUTHRIE i sur., 2003.).

Patogeneza VAK nije do kraja razjašnjena. Općenito je prihvaćeno mišljenje da je patogeno djelovanje posljedica oštećenja arterija zbog umnažanja virusa u endotelnim stanicama te izazivanja diseminiranih intravaskularnih koagulacija (BISHOP, 1989.).

Novija istraživanja dokazuju da uzročnik ima afinitet za stanice monocitno/makrofagne loze (SARKAR i sur., 2016.) što daje novi doprinos potpunijem razumijevanju patogeneze.

Zbog mogućnosti brzog širenja te gospodarskih i uzgojnih gubitaka, većina država provodi mjere nadzora i suzbijanja VAK. Kako su u središtu epizootiologije pastusi kliconoše, tako su i mjere kontrole primarno usmjerene na otkrivanje pastuha kliconoša i njihovo isključivanje iz rasploda. Najčešći sustavi nadzora provode se serološkim pretraživanjem svih pastuha prije sezone rasplodivanja te virološkom i molekularnom pretragom najmanje dva uzorka ejakulata serološki pozitivnih životinja. Uz navedeno, provodi se i pretraživanje kobilica i plodova u slučaju pobačaja kao i životinja u kojih klinički znakovi upućuju na VAK. U dijagnostici se koriste različite laboratorijske metode, od kojih se za serološku dijagnostiku najčešće koriste imunoenzimni (ELISA) i virus-neutralizacijski test (VN-test). Iako postoji veći broj razvijenih ELISA testova, rezultati njihove validacije su se razlikovali u pojedinim istraživanjima te je opće prihvaćeno da niti jedan od njih nema specifičnost i osjetljivost istovjetnu VN-testu (NUGENT i sur., 2000.; WAGNER i sur., 2003.). Za dokaz uzročnika koriste se metode izdvajanja virusa na staničnim kulturama (linijska stanična kultura RK-13) i molekularne pretrage (ANONIMNO, 2013.b; BALASURIYA, 2014.).

Cilj istraživanja je ustanoviti seroprevalenciju VAK na području RH u razdoblju od 2009. do 2015. godine uz određivanje epizootioloških značajki pojavnosti bolesti u specifičnim prilikama konjogojstva RH. Istražit će se mogućnosti primjene komercijalno dostupnih ELISA dijagnostičkih kompleta kao i razina genskih izmjena terenskih sojeva radi mogućeg utjecaja na pouzdanost molekularne dijagnostike. Uz navedeno tipizirat će se terenski sojevi virusa prvi put na području RH. Sveukupno će istraživanje rezultirati

procjenom učinkovitosti dosadašnjih mjera kontrole i suzbijanja bolesti na području RH te znanstveno utemeljenim smjericama za provođenjem mjera u budućnosti.

## **2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA**

### **2.1. Povijest**

Virus virusnog arteritisa konja je prvi put izoliran iz pluća pobačenog fetusa konja, pasmine američki kasač, blizu grada Bucyrus, u saveznoj državi Ohio, Sjedinjene Američke Države, 1953. godine, nakon velike epidemije s kliničkom slikom pobačaja i respiratornih oboljenja (DOLL i sur., 1957.a.; DOLL i sur., 1957.b). To je bilo prvi put da je VAK dijagnosticiran kao etiološki zasebna bolest uz svojstvena oštećenja krvnih žila (JONES i sur., 1957.). Izdvajanjem uzročnika VAK omogućeno je razlikovanje bolesti od infekcije virusom influence konja i infekcija konjskim alfaherpesvirusima tip 1 i tip 4 (EHV-1, EHV-4), koji potencijalno uzrokuju slične respiratorne i reproduktivne kliničke znakove u konja (DOLL i sur., 1957.a.; DOLL i sur., 1957.b; BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Iako do 1953. godine VAK nije bio prepoznat kao nova bolest još se krajem osamnaestog i početkom devetnaestog stoljeća pojavljuju opisi bolesti koji kliničkim znakovima nalikuju VAK i koje je nemoguće klinički razlikovati, te se opisuju pod nazivima „pinkeye“, „infekciozni ili epizootski celulitis“, „influenza erysipelatosi“, „Pferdestaupe“, „Rotlaufseuche“ i „influenza konja“ (CLARK, 1892.; BURKI, 1966.; BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.; OIE, 2018.).

U Republici Hrvatskoj prisustvo VAK prvi put je opisano 2009. godine na temelju pretraživanja arhivskih uzoraka seruma iz 2005. godine, koji su uzeti od sportsko rekreacijskih konja s područja Grada Zagreba, i u kojih je dokazana seroprevalencija od 9% (BARBIĆ i sur., 2009.). Osim navedenog, na tri lokacije tijekom 2008. godine, temeljem učinjenih laboratorijskih pretraga i Izvješća o rezultatima pretraživanja Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI), utvrđen je VAK i to na Hipodromu u Gradu

Zagrebu, Državnoj ergeli lipicanaca u Đakovu i kod posjednika na području Nove Kapele. S obzirom na dostupne podatke, na jednoj lokaciji je došlo do pozitivnog nalaza temeljem obveznog pretraživanja konja koji su trebali nastupati na utrci zaprega u Republici Mađarskoj, a koja je zahtijevala pretragu na protutijela prije ulaska kopitara na njeno područje. Slijedom utvrđenog pozitivnog nalaza pretražena je krv svih 36 kopitara koji su se nalazili na predmetnoj lokaciji, a laboratorijsko pretraživanje je pokazalo pozitivnu serološku reakciju s dokazom protutijela u ukupno 27 kopitara. Hrvatski veterinarski institut je prosljedio uzorke krvi u ovlaštenu laboratorij u Weybridgeu, Ujedinjeno Kraljevstvo, radi potvrđne pretrage metodom VN-test. Rezultati pretrage potvrdili su rezultate pretraga provedenih u HVI-u Zagreb. Dodatno su provedena i uzorkovanja krvi (pune krvi s antikoagulansom) od 20 kopitara i uzeti su obrisici oka i nosa (u transportnom mediju) u svrhu izdvajanja uzročnika, odnosno dokaza EAV molekularnom pretragom. Laboratorijsko izvješće je pokazalo da nije prisutna akutna infekcija i nije utvrđena prisutnost dijelova genoma EAV. Na drugoj lokaciji (Grad Zagreb) u jednog konja su utvrđena protutijela na VAK koji se nalazio u objektu u kojem su boravila još 24 sportska konja koja nisu bila za rasplod. Svrha pretraživanja na VAK u predmetne životinje je bilo izdavanje rješenja o trajnom uvozu. Ponovno je uzet uzorak krvi koji je pretražen u laboratoriju Veterinarskog fakulteta u Ljubljani, radi potvrđne pretrage metodom VN-testa kojim je utvrđen titar protutijela 1:32 za EAV (osobna komunikacija).

Na temelju navedenih spoznaja o proširenosti bolesti na području RH, 2009. godine se uvodi sustavna kontrola bolesti na državnoj razini (ANONIMNO, 2009.b; ANONIMNO, 2009.c; ANONIMNO, 2009.e; ANONIMNO, 2009.f). Određeno je godišnje serološko pretraživanje necijepljenih pastuha koji se koriste za proizvodnju sjemena za umjetno osjemenjivanje ili prirodni pripust, a provedba je određena prije sezone pripusta. Također

je određeno da se kod svakog pobačaja kobile, krv serološki pretraži na VAK. U cilju jednoznačnog pristupa u slučaju sumnje ili potvrđenog slučaja VAK, odnosno provedbe mjera kontrole predmetne bolesti, izrađen je i Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja (ANONIMNO, 2009.e). Princip kontrole bolesti sastojao se u serološkom pretraživanju imunoenzimnim testom (ELISA) te pozitivnih nalaza VN-testom kao potvrđnom metodom koja je referentna dijagnostička metoda određena od strane OIE-a. U slučaju utvrđivanja serološki pozitivnog pastuha predviđalo se pretraživanje najmanje dva uzorka ejakulata na prisustvo virusa radi dokaza kliconoštva virološkom i molekularnom pretragom. Pastusi s dokazanim izlučivanjem virusa ejakulatom morali su se isključiti iz rasploda. Uz navedeno, tijekom godina bilo je određeno i pretraživanje kopitara s kliničkim znakovima koji mogu upućivati na VAK kao i obvezno pretraživanja kobilica u slučaju pobačaja te preporuke o pretraživanju kobilica prije sezone pripusta. Od tada bolest se redovito nadzire na području RH s modifikacijama u programu nadzora.

## **2.2. Zemljopisna proširenost**

Bolest je proširena diljem svijeta. Proširenost bolesti značajno varira u različitim državama, kao i na različitim epizootiološkim područjima unutar njih. Prema službenim podacima OIE-a u razdoblju od 2005. do 2021. godine VAK je prijavljen u 32 države diljem svijeta. Osim u RH, bolest je prijavljena u Belgiji, Češkoj, Estoniji, Finskoj, Francuskoj, Irskoj, Njemačkoj, Danskoj, Mađarskoj, Italiji, Nizozemskoj, Poljskoj, Rusiji, Slovačkoj, Sloveniji, Srbiji, Španjolskoj, Švicarskoj, Švedskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu Velike Britanije i Sjeverne Irske, Maroku, Tunisu, Libiji, Argentini, Kanadi, Kubi, Čileu, Sjedinjenim Američkim državama (SAD), Venezueli, Mongoliji i Australiji, s time da u Venezueli bolest nije potvrđena već je prijavljivana kontinuirano samo kao sumnja na bolest (OIE-WAHIS, 2022.). Važno je napomenuti da svi podaci u OIE-

WAHIS-u nisu još konačni za razdoblje od 2020. godine do 2021. godine s obzirom da OIE nije još validirao sve podatke za sve regije, tako da su moguća manja odstupanja u konačnim podacima. Naime, tijekom 2020. godine, baza podataka OIE-a odnosno OIE-WAHIS-a, nadograđena je na učinkovitiju i prilagođeniju platformu, koja je pokrenuta tijekom 2021. godine (<https://www.report2020oie.fr/en/better-data-for-better-animal-health/>), stoga prilikom ulaska u bazu s autoriziranim pristupom vidljivo je da još nedostaju pojedini podaci za određenu državu što govori u prilog činjenici da su moguća odstupanja u konačnom validiranom izvješću o pojavnosti VAK-a u svijetu od strane OIE-a.

Ono što je vrlo važno u razumijevanju proširenosti odnosno pojavnosti bolesti jest činjenica da u pravilu države nemaju nacionalne programe kontrole koji sustavno nadziru proširenost uzročnika bolesti već isto u većini slučajeva ovisi o znanju i osviještenosti samih uzgajivača kopitara i preporuke od strane veterinara kao i sustava obvezne prijave bolesti na nacionalnoj razini koji se znatno razlikuje u trećim zemljama, odnosno državama izvan područja Europske unije. Osim navedenog, na potvrdu bolesti su svakako utjecali i propisi na razini Europske unije, trećih zemalja odnosno međunarodni standardi OIE-a koji su definirali kriterije uvoza i premještanja kopitara između država. Tako se generalno, temeljem rezultata seroloških pretraga, smatra da je infekcija VAK potvrđena na području Sjeverne i Južne Amerike, Europe, Australije, Afrike i Azije dok se smatra da su samo Island i Japan slobodni od VAK (BALASURIYA, 2014.). Rezultati studije koja je objavljena 2013. godine (MCFADDEN i sur., 2013.) u kojoj su obrađeni rezultati pretraživanja konja u razdoblju od 2001. do 2011. godine na području Novog Zelanda, pokazuju da na navedenom području također nema dokaza o prisustvu VAK. Dodatno, na temelju podataka OIE-a, zadnji slučaj VAK na području Novog Zelanda je prijavljen



2001. godine te su redovno dostavljali informacije OIE-u u kojem je vidljivo da je zadnji pozitivni pastuh uginuo u lipnju 2012. godine. S obzirom na prikupljene dokaze i dostavljenu dokumentaciju na stranicama OIE-a, objavljena je samodeklaracija kojom se Novi Zeland proglašava slobodnom od VAK (OIE, 2014.).

U Sjedinjenim Američkim Državama zabilježen je vrlo visok postotak (70% - 90%) odrasle populacije konja pasmine američki kasač koji su seropozitivni na VAK. Također je zabilježena značajna pasminska dispozicija tako da je primjerice u Saddlebred pasmine ustanovljen postotak seropozitivnih u rasponu od 8% do 25%, a u ostalih toplokrvnih pasmina seroprevalencija je bila vrlo niska, odnosno niža od 5,4% (BALASURIYA, 2014.). MORAILLON i sur. (1978.) u svom radu prikazuju rezultate utvrđene seroprevalencije za Englesku od 14,2%, Portugal 22%, Francusku 15,2%, dok je općeniti postotak rezultata seroprevalencije VAK za europske zemlje oko 28%, a za afričke zemlje oko 37%. U navedenom radu je prikazana i vrlo visoka seroprevalencija u kopitara iz Austrije od 58,6%, dok BURKI i sur. (1992.) u svom radu prikazuju rezultate seroprevalencije u Austriji u toplokrvnih pasmina u rasponu od 55,6% do 93,3% te navodi da je prva izolacija EAV napravljena još 1968. godine, a protutijela su prvi put dokazana 1976. godine.

U Argentini su protutijela na VAK utvrđena još 1984. godine, međutim prva izolacija EAV opisana je u radu iz 2003. godine, kada je virus dokazan u sjemenu pastuha koji se nalazio u karanteni zbog obveznih zdravstvenih mjera prilikom uvoza te je bio rutinski pretražen VN-testom s pozitivnim rezultatom (ECHEVERRIA i sur., 2003.). U relativno nedavnom istraživanju u Srbiji LAZIĆ i sur. (2017.) su dokazali da su protutijela utvrđena u 15,88% od ukupno 340 pretraženih kopitara. U Nizozemskoj je još 1979. godine dokazana seroprevalencija od 14% na ukupno pretraženih 556 kopitara na VAK (DE

BOER i sur. 1979.) U Njemačkoj je 1995. godine dokazana seroprevalencija od oko 20% (EICHHORN i sur., 1995.). U Ujedinjenoj Kraljevini Velike Britanije i Sjeverne Irske nakon epidemije VAK 1993. godine, serološka pretraga 9203 uzoraka krvi necijepljenih kopitara, provedena tijekom 1995. godine, pokazala je 2% seroprevalenciju na VAK, dok je tijekom 1996. godine od 8851 necijepljenih kopitara utvrđena seroprevalencija od 0,52% (NEWTON i sur., 1999.).

U svom radu SZEREDI i sur. (2003.) godine citiraju podatak iz rada od RUSVAI i sur. (1995.) u kojem se navodi da je u Mađarskoj seroprevalencija na VAK relativno visoka i kreće se u rasponu od 27,8% do 62,8%. Za Italiju su dostupni podaci prikupljeni preko centralnog informacijskog sustava National Reference Centre for Equine Diseases (CeRME) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, za razdoblje od 2004.-2007. godine, koji navodi porast seroprevalencije od 8,2% do 10% pretraženih pastuha dok se broj slučajeva VAK kreće oko 4,5% godišnje.

U RH prije uvođenja nadzora VAK cirkulacija uzročnika je serološki potvrđena 2005. godine na području Zagreba (BARBIĆ i sur., 2009.) te 2008. godine (osobna komunikacija) što je opisano u prethodnom potpoglavlju.

## **2.3. Etiologija**

### **2.3.1. Klasifikacija i taksonomija virusa VAK**

Uzročnik VAK je virus koji je svrstan u porodicu *Arteriviridae*, podporodica *Equarterivirinae*, rod *Alphaarterivirus*, vrsta *Alphaarterivirus equid* prema Međunarodnom odboru za taksonomiju virusa (ICTV) iz lipnja 2021. godine (ICTV, 2021.). Također prema zadnjoj taksonomiji, porodica pripada redu *Nidovirales*, podredu

*Arnidovirineae* i obuhvaća šest potporodica (*Equarterivirinae*, *Simarterivirinae*, *Variarterivirinae*, *Zealarterivirinae*, *Heroarterivirinae* i *Crocarterivirinae*), 13 rodova 11 podrodova i 23 vrste.

Virusi iz reda *Nidovirales* u koje pripada osam podredova, 14 porodica, 25 podporodica, 39 rodova, 65 podrodova i 109 vrsta (ICTV, 2022.) imaju sličnu organizaciju genoma i način replikacije virusa, uglavnom karakteriziranu stvaranjem ugniježdenog skupa subgenomskih virusnih glasničkih ribonukleinskih kiselina (RNK) (SNIJDER i sur. 2006., BALASURIYA i sur., 2013.).

Osim EAV, taksonomska skupina porodice *Arteriviridae* (ICTV, 2022.) uključuje virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (*engl.* Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome), virus koji povećava laktat dehidrogenazu miševa (LDV), virus šimijanske hemoragijske groznice (SHFV) i virus bolesti oposuma (WPDV). Različiti arterivirusi nedavno su identificirani i u azijskih glodavaca, afričkog divovskog vrećastog štakora (*engl.* african pouched rats), afričkih divovskih rovki, voluharica u Europi i novozelandskih oposuma (ICTV, 2021.)

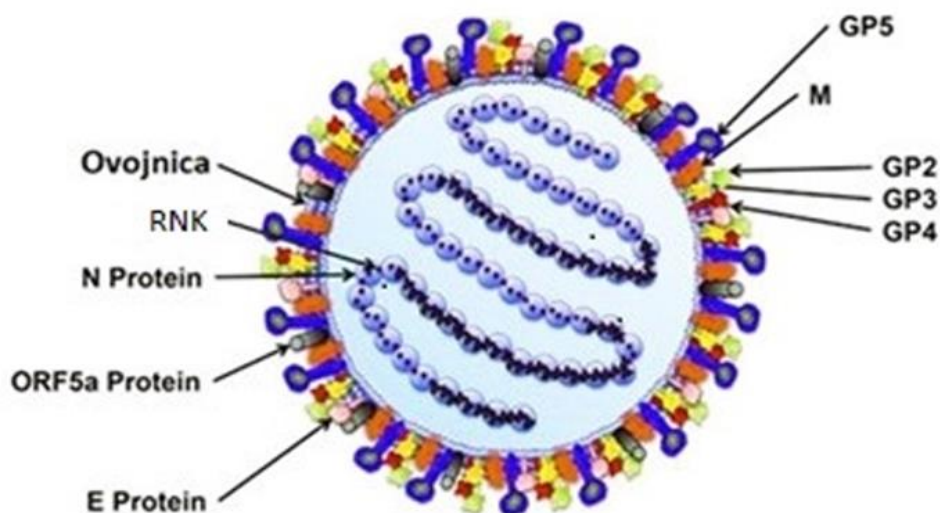
Virus arteritisa konja je mali, veličine 50-74 nm, ovijeni, RNK virus s jednostrukom pozitivno orijentiranom RNK. Genomska RNK okružena je nukleokapsidnim (N) proteinom. Nukleokapsid je okružen lipidnom ovojnicom s malim površinskim izdancima, a sastoji se od glavnog proteina virusne ovojnice GP5 (glikoprotein 5) i pridruženog proteina M (membrane) koji pokriva cijelu površinu virusne čestice (SPILMAN i sur., 2009.; BALASURIYA i sur., 2013.; ICTV 2021.). Duljina genoma varira između 12,7 i 15,7 kilobaza (kb) između različitih sojeva virusa i uključuje 5'

vodeću sekvencu (224 nukleotida) i najmanje deset otvorenih okvira čitanja (BALASURIYA i sur. 2013.; BALASURIYA, 2014).

Molekularna epizootologija VAK potvrdila je da su sojevi virusa serološki jedinstveni, ali genski heterologni što ima i klinički značaj jer se ishod infekcije razlikuje ovisno, među ostalim, i o soju virusa (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA i sur., 2013.). Stoga je molekularna tipizacija uzročnika od velikog značaja. Prvu podijelu temeljem molekularne tipizacije i filogenetskih analiza načinio je STADEJEK i sur. (1999.) podijelivši uzročnike u skupine A, B i C s tim da se virusi pripadnici skupina A i B dodatno dijele u podskupine AI i AII, odnosno BI i BII. Rezultatima daljnjih istraživanja EAV sojevi su razdijeljeni u tri skupine EAV-1, EAV-2 i EAV-3 (MITTELHOLZER i sur. 2006.) da bi godinu kasnije ZHANG i sur. (2007.) uspostavili temeljnu klasifikaciju u sjeverno američke (NA) i europske sojeve (EU) koji se dalje dijele u EU-1 i EU-2 skupinu. Ovakva klasifikacija sojeva EAV se uobičajeno koristi i danas iako su neki autori načinili i dodatnu klasifikaciju na način da su sojeve EAV razvrstali u sedam skupina označenih abecednim redom od A do G (STEINBACH i sur., 2015.) kako bi izbjegli zabune zbog povremenog pojavljivanja sjeverno američkih sojeva u Europi i obrnuto.

Virus arteritisa konja je osjetljiv te ga lako inaktiviraju uobičajeni dezinficijensi, deterđenti i otapala lipida (eter, butanol i kloroform). Stabilan je pri pH 6,0 i 7,5 dok se inaktivira kod visokog ili niskog pH. Poluživot virusa postupno se smanjuje s porastom temperature (ICTV, 2022.) Virus preživljava 75 dana na 4°C, između dva do tri dana na 37°C i 20 do 30 minuta na 56°C. Uzorci organa i staničnih kultura koji sadrže virus mogu se godinama čuvati pri -70°C do -80°C bez značajnog gubitka infektivnosti, dok u

sjemenu i zametku u krio konzerviranom obliku virus također preživljava dugi niz godina (BALASURIYA, 2014.; BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.).



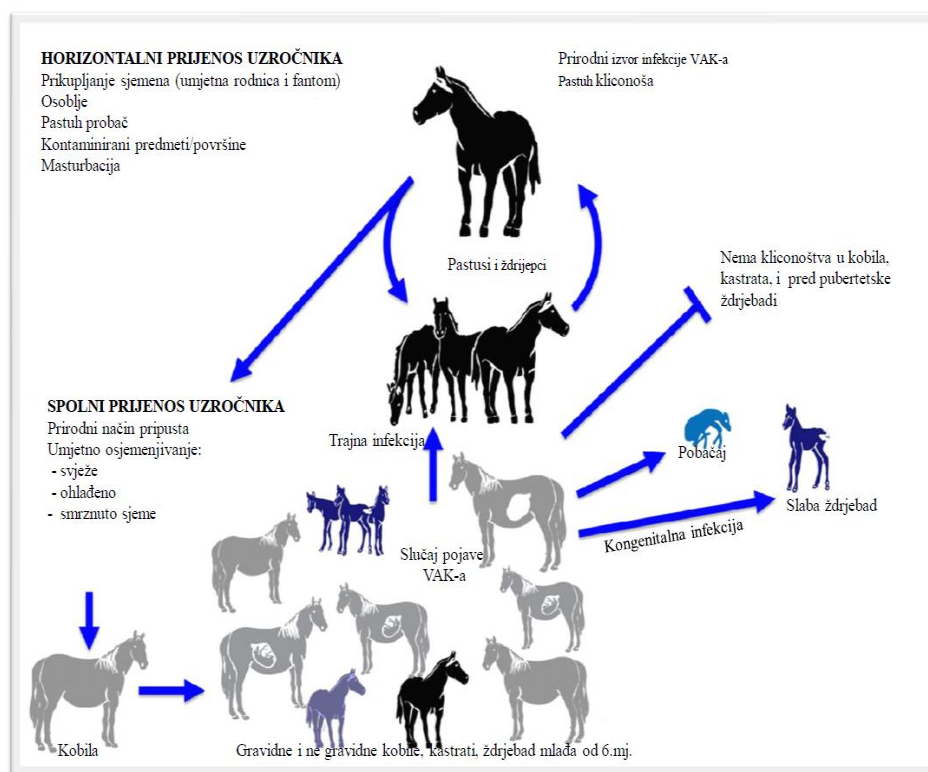
**Slika 1.** Građa virusa. EAV čestica sastoji se od nukleokapside (N) i 7 ovojničnih proteina, koji uključuju 2 glavna proteina ovojnice (GP5 i M koji čine dimer), 3 manja ovojnična glikoproteina (GP2, GP3 i GP4 koji čine trimer) te dva druga manja proteina ovojnice (E i ORF5a protein). Prilagođeno iz BALASURIYA, 2014.

## 2.4. Epizootiologija

Virusni arteritis konja je zarazna, virusna, respiratorna i spolna bolest kopitara koju uzrokuje EAV. Virus se između kopitara širi horizontalnim i vertikalnim putem (Slika 2.) (MCCOLLUM i sur., 1971.; TIMONEY i sur. 1986.; TIMONEY i MCCOLLUM 1993.; BALASURIYA, 2014.). Jedan od najvažnijih načina širenja VAK je respiratornim putem i to aerosolom iscjetka iz dišnog sustava koji potječe od akutno zaraženih kopitara, čemu u prilog ide dokazan visok titar virusa u nazofarinksu sedam do 14 dana nakon izlaganja virusu, tijekom akutne faze infekcije (MCCOLLUM i sur.,1971.; TIMONEY i sur.,

1993.; BALASURIYA, 2014.). Za prijenos EAV putem aerosola neophodan je izravan i bliski kontakt prijemljivih jedinki (COLLINS i sur., 1987.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1988.). Drugi iznimno važan način prirodnog širenja EAV je spolnim putem, sjemenom akutno ili kronično zaraženih pastuha (MCCOLLUM i sur., 1971.; TIMONEY i sur., 1986.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.). Kronično zaražen pastuh odnosno pastuh kliconoša, ključna je karika u održavanju infekcije EAV u populaciji kopitara s obzirom da se u 85% do 100% seronegativnih kobila koje su držane u uzgoju s pastuhom kliconošom u roku od 28 dana utvrdi serokonverzija (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.). Mehanizam kliconoštva u pastuha nije do kraja razjašnjen ali dokazano je da ovisi o testosteronu (MCCOLLUM i sur., 1994.). Kliconoštvo u pastuha može trajati kratkotrajno ili nekoliko tjedana nakon oporavka pa do nekoliko mjeseci ili godina te čak i doživotno (TIMONEY i sur., 1986.; TIMONEY i MCCOLLUM 1993.; BALASURIYA I MACLACHLAN 2014.). Pastuh kliconoša kontinuirano izlučuje virus u sjemenu, s time da virus nije prisutan u krvi, urinu ili drugim tjelesnim izlučevinama. Navedeno upućuje da je u pastuha kliconoše EAV ograničen na reproduktivni sustav, a nalazi se u ampuli *ductusa deferensa* i dodatnim spolnim žlijezdama (TIMONY i MCCOLLUM 1993.; BALASURIYA, 2014.). U literaturi se navode različiti podaci od 10% do čak 70% pastuha koji nakon primarne infekcije ostaju trajno zaraženi te predstavljaju stalni izvor zaraze i izlučuju virus u sjemenu, dok u kobila, kastrata ili ždrjebadi nema dokaza o trajnoj infekciji (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; HOLYOAK i sur., 2008.). Kobile se učestalo zaražavaju i spolnim putem, prirodno tijekom koitusa, ali kobile se mogu zaraziti i putem umjetnog osjemenjivanja ukoliko se u sjemenu nalazi EAV (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Kobile koje se zaraze bilo prirodnim putem ili umjetnim osjemenjivanjem razviju kliničke znakove VAK i

mogu lako prenijeti virus respiratornim putem unutar prijemljive populacije (BALASURIYA, 2014.). VAK se također može prenijeti aerosolom mokraćne i drugih sekreta akutno zaraženih konja, pobačenih fetusa, plodne tekućine i plodnih ovojnica (MCCOLLUM i sur., 1971.; GLASER i sur., 1996.; GUTHRIE i sur., 2003.; BALASURIYA, 2014.). Iako se virus može prenijeti i vaginalnim sekretom, fecesom (FUKUNAGA i sur., 1981.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.) i urinom (MCCOLLUM i sur., 1971.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.) tijekom akutne faze infekcije, respiratorni put širenja virusa ima puno veći značaj zbog duljeg trajanja i veće količine izlučenog virusa (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). VAK se može prenijeti i indirektnim kontaktom preko kontaminiranih predmeta i osoba iako takav način ima generalno značajno manju ulogu u širenju virusa. Ipak, tijekom epizootije VAK koja se dogodila u veterinarskoj nastavnoj bolnici na Sveučilištu Colorado tijekom ljeta i jeseni 1984. godine, pokazalo se da i takav način širenja ima važnu ulogu u prijenosu virusa (COLLINS i sur., 1987.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). VAK se može prenijeti i aerosolom iz zaraženog sjemena nakon masturbacije (GUTHRIE i sur., 2003.). Također i kobili koja je serološki negativna može se prenijeti virus putem embrija od kobile donora koja je oplođena zaraženim sjemenom (BROADDUS i sur., 2011.a.; BALASURIYA, 2014.). Nadalje, ukoliko se kobila zarazi tijekom kasne gestacije može doći do transplacentalnog prijenosa virusa te nastaje urođena infekcija ždrebadi u kojih se često, u pravilu brzo, razvija progresivna, fulminantna intersticijska upala pluća i fibronekrotični enteritis (GOLNIK i sur., 1981.; VAALA i sur., 1992.; BALASURIYA i sur., 2016.a). Eksperimentalno je dokazan način prijenosa EAV intravenozno, subkutano, intranazalno i intratrahealnom inokulacijom suspenzije pluća ili slezene od akutno zaraženih konja (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.).



**Slika 2.** Prijenos uzročnika VAK i posljedice u populaciji kopitara. Prilagođeno iz BALASURIYA i sur., 2016.a

## 2.5. Klinička slika

Klinička slika oboljelih kopitara ovisi o puno čimbenika koji uključuju genetiku, dob, fizičku kondiciju, izloženost uzročniku, načinu ulaska uzročnika u organizam, soj virusa i uvjete okoliša (VAALA i sur., 1992.; TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.). Iako je poznat samo jedan serotip EAV-a, poznate su brojne varijacije u virulenciji terenskih sojeva (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.; BALASURIYA 2014.). Na temelju izraženosti kliničke slike bolesti tijekom prirodne infekcije, terenski sojevi EAV-a mogu se razdvojiti u viruse koji uzrokuju umjerenu do tešku kliničku sliku bolesti (npr. EAV KY84, EAV AZ87, EAV IL93 i EAV PA96), blagu kliničku sliku bolesti (npr. EAV SWZ 64, EAV AUT68, EAV IL94 i EAV CA97) i one

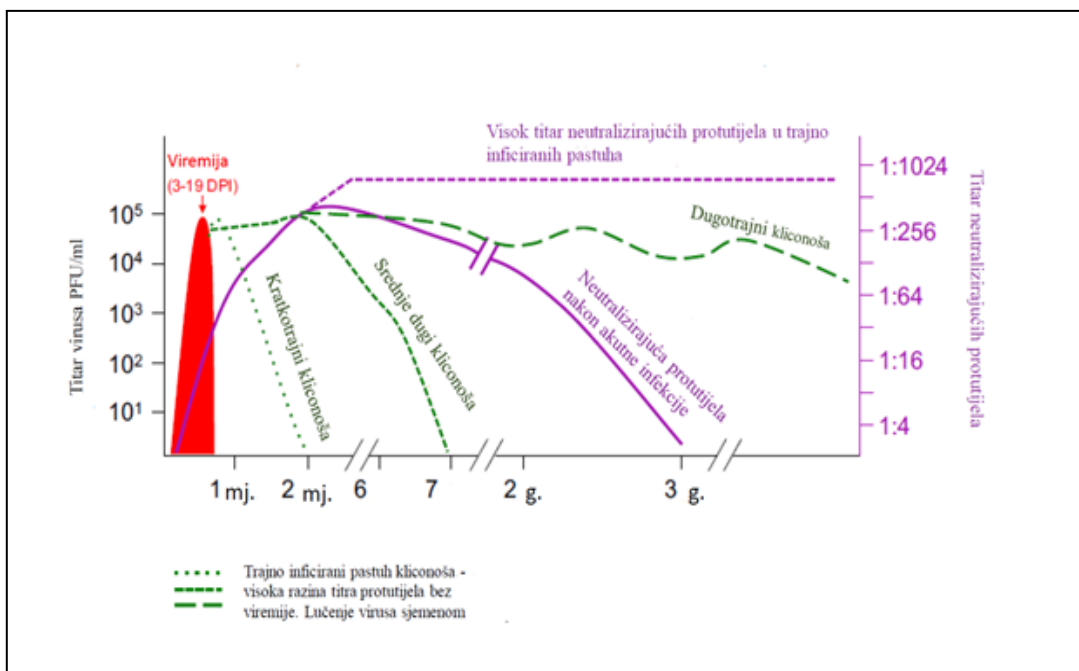


koji uzrokuju asimptomatske infekcije (EAV KY63, EAV PA76, EAV KY77 i EAV CA95) (MOORE i sur., 2002.; BALASURIYA 2014.). Slično tome, laboratorijski i cijepni sojevi značajno se razlikuju u svojoj virulenciji od visoko virulentnog, konjima prilagođenog soja Bucyrus (virulentni Bucyrus soj (VBS) VAK; ATCC VR-796)) do visoko oslabljenog, modificiranog, živog virusa (OMV) od kojega se proizvodi cjepivo, te visoko oslabljenog, rekombinantnog soja EAV 030 (BALASURIYA, 2014.; BALASURIYA i sur. 2014.). Po trenutnim spoznajama, uz izuzetak eksperimentalno dobivenog i visoko prilagođenog VBS-a, ostali sojevi i terenski izolati EAV vrlo rijetko uzrokuju fatalnu infekciju u odraslih konja (MACLACHLAN i sur., 1996.; PRONOST i sur., 2010.; BALASURIYA, 2014.). Stoga infekcija s EAV većinom prolazi inaparentno, posebno one koje se pojavljuju u kobilama koje se drže s trajno zaraženim pastusima (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA 2014.). Eksperimentalne infekcije s velikim dozama virusa rezultirale su visokom smrtnošću odraslih konja i ždrijebadi, a smrt je nastala u kratkom vremenu sa kliničkim znakovima šoka (GOLNIK i sur., 1981.). Inkubacijsko razdoblje VAK je od dva do četrnaest dana, a u pravilu šest do osam dana nakon spolnog kontakta (BALASURIYA i sur., 2016.a). Klinička slika je praćena vrućicom do 41° C koja može trajati dva do devet dana (Slika 3.) (BALASURIYA, 2014.; BALASURIYA i sur. 2014.). Vrlo mladi, stari, slabi i imunosuprimirani konji mogu razviti širok raspon kliničkih znakova, uključujući povišenu temperaturu, depresiju, anoreksiju, rinitis s nosnim i očnim iscjetkom, peri- i supraorbitalne edeme, edeme skrotuma, mamarnih žlijezda i edeme ekstremiteta, ukočenost hoda, urtikarije (koje mogu biti lokalizirane na bočnim stranama vrata ili lica ili mogu biti generalizirane po tijelu) i leukopeniju (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA 2014.) Od navedenoga najčešće kliničke značajke infekcije su vrućica i leukopenija (DOLL i sur., 1957a.;

BALASURIYA i sur., 2002.a; BALASURIYA 2014.). Rjeđi klinički znakovi koji se povremeno pojavljuju su: žutica, fotofobija, zamućenost rožnice, kašalj i dispneja, bol u trbuhu i proljev, ataksija, petehijalna krvarenja na nosnoj sluznici, konjunktivi i sluznici usne šupljine, submaksilarna i submandibularna limfadenopatija i edem u intermandibularnom prostoru, ispod prsne kosti ili u ramenoj regiji (BALASURIYA, 2014.). Prilikom prirodne infekcije, od 10% do 71% zaraženih kobilica pobačaji (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA 2014.). Do pobačaja dolazi u bilo kojem trenutku između trećeg i desetog mjeseca gravidnosti. Potencijal različitih sojeva u izazivanju pobačaja nije potpuno istražen, ali čini se da se sojevi razlikuju u svom potencijalu za uzrokovanje pobačaja kao što je to izraženo i u intenzitetu respiratornih kliničkih znakova koje uzrokuju (BALASURIYA, 2014.). Također podaci upućuju da u kobila koje su se zarazile koitusom u kontaktu s pastuhom kliconošom, naknadno nema problema s plodnošću (TIMONEY, 1993.; BALASURIYA, 2014.; BALASURIYA i sur., 2016.a). Infekcija EAV može uzrokovati tešku, intersticijsku upalu pluća, koja brzo napreduje u tek oždrebljenih životinja kao i progresivnu pneumoniju te gastrointestinalni sindrom u starije ždrijebadi (VAALA i sur., 1992.; BALASURIYA, 2014.). Nakon 28 dana od infekcije EAV nestaje iz tkiva zaraženih kopitara. Međutim, veliki broj akutno zaraženih pastuha (10% –70%) ostaju trajno zaraženi i izlučuju virus u sjemenu, dok u kobila, kastrata ili ždrijebadi nema dokaza o trajnoj infekciji (TIMONEY i MCCOLLUM 1993.; HOLYOAK i sur., 2008.; BALASURIYA, 2014.).

U zaraženom pastuhu virus perzistira u reproduktivnom sustavu u ampuli *ductusa deferensa* i dodatnim spolnim žlijezdama te je stanje kliconoštva izravno ovisno o testosteronu čemu u prilog ide nemogućnost kronične infekcije u spolno nezrelih ždrijebaca (TIMONEY i MCCOLLUM 1993.; BALASURIYA, 2014.). Virus se u pastuha

počinje izlučivati u sjemenu pet dana nakon infekcije i u najvećem titru se nalazi u frakciji ejakulata bogatoj spermom (NEU i sur., 1992.; CAMPOS i sur. 2014.). U pastuha se tijekom akutne infekcije pojavljuje privremena slabija plodnost koja je povezana sa smanjenim libidom, pokretljivošću i brojem spermija te povećanim postotkom morfološki abnormalne sperme u ejakulatu (BALASURIYA, 2014.). Eksperimentalnom infekcijom s EAV dokazano je da slabija plodnost može trajati do sedam tjedana po infekciji (TIMONEY i MCCOLLUM 1993.; NEU i sur., 1992.; BALASURIYA, 2014.). Tijekom akutne infekcije, edem skrotuma i povišena temperatura mogu dovesti do negativnih učinaka na sve parametre kakvoće sjemena, uključujući postotak ukupne pokretljivosti i postotak progresivne pokretljivosti spermija, ukupan broj spermija, brzinu nepravilnog kretanja te postotak živih i postotak morfološki normalnih spermija (BALASURIYA, 2014.). Eksperimentalnom infekcijom u kojoj je inficirano sedam spolno zrelih (4 -16 godina) pastuha raznih pasmina dokazano je da između devet do 76 dana nakon infekcije dolazi do značajnog smanjenja navedenih parametara kojima se procjenjuje kvaliteta sjemena (CAMPOS i sur., 2014.). Uobičajene abnormalnosti sperme uključuju promjene na glavi, srednjem djelu i repu spermija (odvojena glava, protoplazmatska kapljica te defekti repa, srednjeg dijela i akrosome) (BALASURIYA, 2014.). S obzirom da se unatoč visokom titru virusa u sjemenu trajno zaraženih pastuha u kojih se visina titra virusa u sjemennoj plazmi kreće od  $10^1$  do  $> 10^7$  PFU/ml (PFU – jedinice koje formiraju plak), kvaliteta sjemena vraća na početnu razinu, čini se da virus ima malo ili nimalo izravnog učinka na spermije (CAMPOS i sur., 2014.).



Slika 3. Rezultat infekcije EAV. Prilagođeno iz: BALASURIYA, 2014.

## 2.6. Patogeneza

Patogeneza VAK proučavana je na dva načina i to pokusnom infekcijom konja sojevima virusa različite virulencije uz različite načine primjene (intranazalno, intramuskularno i intravenozno) te praćenjem i evaluacijom prirodnih slučajeva pojave bolesti (MCCOLLUM i sur., 1971.; FUKUNAGA i sur., 1981.; BALASURIYA i sur., 2002.a; BALASURIYA, 2014.). Kvantitativna raspodjela EAV uvelike se razlikovala između pojedinih pokusa, što vjerojatno odražava svojstvene razlike u načinu infekcije, dozi virusa, soju virusa i kvaliteti uzoraka koji se koristio za dokaz virusa (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Iako su zabilježeni slučajevi uginuća uslijed infekcije EAV, treba naglasiti da uz iznimku fetalnih i neonatalnih infekcija, do uginuća konja dolazi vrlo rijetko, posebno u prirodnim uvjetima (PRONOST i sur., 2010.; BALASURIYA, 2014.). Nakon respiratorne infekcije, početno umnožavanje virusa odvija se u gornjem dijelu respiratornog trakta u epitelu te alveolarnim makrofagima pluća, unutar 24 sata od

infekcije (BALASURIYA, 2014.; BALASURIYA i sur., 2016.a). Virus se u roku od 48 sati pojavljuje u regionalnim limfnim čvorovima, posebno bronhijalnim, a u roku od tri dana, virus je prisutan u krvi i gotovo svim organima i tkivima gdje se replicira u makrofagima i endotelnim stanicama (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.). Viremija traje od tri do 19 dana poslije infekcije (MCCOLLUM i sur., 1971.; BALASURIYA, 2014.). Virus se može izdvojiti iz nazofarinksa za dva do 14 dana nakon infekcije, a iz trombocitno – leukocitnog međusloja (*engl.* Buffy coat) za dva do 19 dana nakon infekcije (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.).

Tijekom infekcije dolazi do oštećenja endotelnih stanica i povećane propusnosti krvnih žila (BALASURIYA i sur., 2013.; BALASURIYA, 2014.). Iako su endotelne stanice i makrofagi prepoznati kao glavna mjesta umnažanja virusa, ciljne stanice su i epitelne, mezotelne te glatke mišićne stanice tunike medije manjih arterija i miometrija (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2004.). Klinička slika VAK izravno je rezultat oštećenja endotelnih stanica virusom i povećane vaskularne propusnosti, iako sama uloga i važnost izravnog učinka virusa na endotelne stanice i vazoaktivne upalne citokone makrofaga u patogenezi infekcije EAV još do kraja nije razjašnjena (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2004.). Oštećenja do kojih dolazi zbog infekcije EAV, vjerojatno nisu posljedica imunološkog odgovora jer se razvijaju za samo četiri do pet dana nakon eksperimentalne inokulacije EAV što nije u skladu s imunološki uvjetovanom reakcijom (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). Nadalje, zahvaćene su arterije veće od 1 mm, a ni imunoglobulin G (IgG) ni komplement (C3) nisu prisutni u lezijama, kao što bi se očekivalo da su za nastanak patoloških promjena odgovorni imuni kompleksi (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.).

Prethodne studije *in vitro* i *in vivo* pokazale su povećanu transkripciju gena koji kodiraju proupalne medijatore (interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i faktora tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) nakon infekcije EAV, što upućuje da su ti medijatori citokina presudni u određivanju ishoda infekcije i težine bolesti (MOORE i sur., 2003.; BALASURIYA, 2014.).

Kako je ranije opisano, u gravidnih kobila može doći do pobačaja i bez prethodno vidljivih kliničkih znakova i to između 3. i 10. mjeseca gravidnosti (BRYANS i sur., 1957.; GOLNIK i sur., 1981.; VAALA i sur., 1992.). U pobačenih fetusa mogu se naći: interlobularni plućni edem, pleuralni i perikardijalni izljev te petehijalna i ekhimotična krvarenja na serozi i sluznici tankog crijeva (BALASURIYA, 2014.). Histološki se pri VAK može utvrditi teški nekrotizirajući panvaskulitis malih krvnih žila (BALASURIYA, 2014.). Zahvaćene mišićne arterije pokazuju nekrotična žarišta svih slojeva stjenke, s edemom i infiltracijom limfocita i neutrofila (BALASURIYA, 2014.). Izražene vaskularne lezije vidljive su također u posteljici, mozgu, jetri i slezeni pobačenih fetusa, dok se na plućima zaražene, novorođene ždrijebadi može vidjeti teška intersticijska upala pluća (BALASURIYA, 2014.). Pobačaj do kojeg dolazi nakon infekcije s EAV u gravidnih kobila vjerojatno je posljedica fatalne fetalne infekcije, a ne miometritisa ili oštećenja posteljice koje bi ometalo sintezu progesterona (MACLACHLAN i sur. 1996.). Tkiva pobačenih fetusa sadrže viši titar virusa od onih koji su utvrđeni u kobili od koje potječe pobačeni fetus, što ukazuje na to da se u samom fetusu događa znatna replikacija virusa (MACLACHLAN i sur. 1996.).

Pojedina istraživanja dokazala su da je klinički ishod infekcije EAV ovisan i o genetskim čimbenicima domaćina (GO i sur. 2011.b; GO i sur. 2012.b) Konkretno, na temelju *in vitro* osjetljivosti CD3<sup>+</sup> T-limfocita na infekciju EAV, konji su podijeljeni u dvije

skupine, na osjetljivu i otpornu skupinu. Nakon toga, studija povezanosti genoma identificirala je zajednički, genetski dominantan haplotip povezan s *in vitro* osjetljivim fenotipom u regiji konjskog kromosoma 11 (ECA11; 49572804–49643932). Eksperimentalna inokulacija EAV u konja s *in vitro* osjetljivim ili rezistentnim CD3<sup>+</sup> T limfocitima pokazala je značajnu razliku između dvije skupine konja u smislu proupalne i imunomodulatorne ekspresije glasnike RNK citokina te dokaza o izraženijim kliničkim znakovima u konja koji imaju na EAV *in vitro* otporne CD3<sup>+</sup> T-limfocite (GO i sur. 2012.b). Istraživanje je također pokazalo i da pastusi s CD3<sup>+</sup> T-limfocitima osjetljivim na EAV imaju veći rizik od trajne zaraze u odnosu na pastuhe koji nemaju ovaj fenotip (GO i sur., 2012.a; BALASURIYA 2014.).

Trenutno se nedostavno zna o ranoj fazi patogeneze VAK, koji je točan mehanizam ulaska virusa u stanice domaćina, koje su stanice primarno mjesto umnažanja virusa pri ulasku u domaćina ili koja je uloga i povezanost umnažanja virusa u krvnim žilama s njegovom diseminacijom po cijelom tijelu inficirane životinje. Istraživanja su pokazala da su većina stanica pozitivnih na EAV bile CD172a + mijeloidne stanice, a zatim CD3<sup>+</sup> T-limfociti, dok je samo mali postotak bio IgM+ B-limfocita (VAIRO i sur., 2013.), a interesantno je da istim istraživanjem virus nije dokazan u epitelnim stanicama gornjih dišnih putova tijekom razdoblja akutne infekcije. Sve navedeno potvrđuje da potpuno razumijevanje patogeneze infekcije EAV zahtjeva dodatna istraživanja.

## **2.7. Imunološki odgovor domaćina**

Iako prirodna i pokusna infekcija izazivaju dobar zaštitni odgovor imunološkog sustava u kopitara koji štiti od naknadne infekcije EAV, mehanizam prirodnog odgovora kod EAV nije dovoljno istražen (BALASURIYA i sur., 2016.a). Infekcija EAV potiče humoralni i stanični imunosni odgovor. Virus inhibira proizvodnju interferona tipa I

(IFN-I) u endotelnim stanicama zaraženih kopitara, a značajnu ulogu imaju tri virusna nestrukturna proteina (nsp 1, 2 i 11) koja su sposobna inhibirati aktivnost IFN-I (BALASURIYA, 2014.). Od navedena tri nestrukturna proteina, nsp1 ima najjači inhibitorski učinak na sintezu IFN (GO i sur., 2014.). Jasno je da neuspjeh izazivanja proizvodnje IFN-I u EAV zaraženim stanicama može omogućiti virusu narušavanje prirodnog imunološkog odgovora (BALASURIYA, 2014.). Infekcija EAV u kopitara izaziva dugotrajni imunitet koji vjerojatno štiti od ponovne infekcije homolognim sojem, ako ne, u većini slučajeva, i od svih sojeva virusa (BRYANS i sur., 1957.; BALASURIYA i MACLACHLAN, 2004.).

Nakon prirodne i pokusne infekcije s EAV, kopitari razvijaju protutijela koja omogućavaju vezanje komplementa kao i virusna specifična neutralizirajuća protutijela (FUKUNAGA i MCCOLLUM, 1977.). Protutijela vezanja komplementa razvijaju se jedan do dva tjedna nakon infekcije, dosežu vrhunac nakon dva do tri tjedna i postupno opadaju i nestaju nakon osam mjeseci, dok se neutralizirajuća protutijela razvijaju unutar jedan do dva tjedna nakon izlaganja, vrhunac dosežu dva do četiri mjeseca nakon infekcije i traju tri godine ili čak dulje (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA i sur., 2002.a; BALASURIYA i sur., 2007.; BALASURIYA 2014.).

Pojava neutralizirajućih protutijela podudara se s nestankom virusa iz cirkulacije u akutno zaraženih konja (FUKUNAGA i sur., 1981.; BALASURIYA, 2014.). Međutim, u studiji koju je proveo VAIRO i sur. (2012.) pokazalo se da je virus prisutan u tonzilama i do 28 dana nakon infekcije. U trajno zaraženih pastuha, virus ostaje u spolnom sustavu kroz promjenjivo duže razdoblje, unatoč prisutnosti visokog titra neutralizirajućih protutijela u serumu (Slika 3.) (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.).



U konja koji su izloženi infekciji EAV i strukturni proteini (GP5, M i N) i nestrukturni proteini (nsp2, nsp4, nsp5 i nsp12) induciraju humoralni imunitet (MACLACHLAN i sur., 1998.; GO i sur., 2011.c).

CAROSSINO i sur. (2017.) su utvrdili specifični tropizam EAV za stromalne stanice kao i činjenicu da se virus prvenstveno nalazi u fibrocitima te T (CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) i B (CD21<sup>+</sup>) limfocitima u ampuli *ductusa deferensa*. Studija je pokazala da VAK izražava različiti tropizam prema stanicama domaćina, ovisno o tkivu i trajanju infekcije. Ždrijebad porijeklom od imunih kobila, zaštićena su od pojave kliničkih znakova VAK pasivnim prijenosom neutralizirajućih protutijela putem kolostruma (MCCOLLUM, 1976.; BALASURIYA, 2014.). Neutralizirajuća protutijela pojavljuju se nekoliko sati nakon hranjenja kolostrumom, na najvišoj razini su u prvom tjednu života ždrijebeta nakon čega postupno opadaju do nestanka između drugog i šestog, rijetko sedmog mjeseca starosti (BALASURIYA, 2014.). Biološki poluživot majčinih protutijela u serumu ždrijebeta je 32 dana (BALASURIYA, 2014.).

Do danas nema opsežnih studija koja opisuju stanični imunosni odgovor na VAK u konja. CASTILLO-OLIVARES i sur. (2003.) u istraživanju iz 2003. godine opisuju metode procjene specifičnog odgovora citotoksičnih T-limfocita (CTL) u ponija inficiranih EAV. Mehanizmi odgovorni za nestanak viremije nisu poznati, ali otkrivanje prekursora CD8<sup>+</sup> CTL u rekonvalescentnih ponija nakon infekcije EAV ukazuju na to da bi stanična imunost mogla igrati važnu ulogu u konačnom uklanjanju infekcije. Citotoksičnost izazvana monoaktivnim stanicama periferne krvi stimuliranim EAV bila je specifična za virus, genetski ograničena i posredovana od CD8<sup>+</sup> T-limfocita i mogla se utvrditi u razdoblju od četiri mjeseca do više od jedne godine nakon eksperimentalne infekcije u ponija (CASTILLO-OLIVARES i sur., 2003.). Novijim istraživanjem je također

dokazano da infekcija EAV inducira odgovor protutijela sluznice u reproduktivnom traktu stvaranjem i otpuštanjem specifičnih imunoglobulina (IgA, IgM, IgG1, IgG3/5 i IgG4/7) u sjemensku plazmu, kao i usmjeravanjem plazma stanica u pomoćnim spolnim žlijezdama (CAROSSINO i sur., 2017.).

## **2.8. Dijagnostika**

Klinički znakovi VAK nisu specifični i nalikuju mnogim drugim zaraznim i nezaraznim bolestima kopitara. S obzirom na navedeno, diferencijalno dijagnostički treba postaviti sumnju te laboratorijskim pretragama isključiti i druge zarazne bolesti u kojih se pojavljuju slični klinički znakovi, kao što su: infekcija konjskim alfaherpesvirusom (EHV) 1 i 4, influenza konja, virusi rinitisa konja A i B, adenovirusna infekcija konja, infekciozna anemija kopitara, konjska kuga, infekcija hendra virusom, neke bakterijske bolesti kao primjerice leptospiroza, te nezarazne bolesti kao što su purpura hemorrhagica, urtikarija i pojedine intoksikacije (BALASURIYA, 2014.). Osim navedenog i u slučaju pobačaja kobila potrebno je laboratorijskim metodama razlikovati VAK od primjerice infekcije EHV-1 ili rjeđe EHV-4, salmoneloznog pobačaja ili drugih zaraznih i nezaraznih uzročnika pobačaja.

Laboratorijska dijagnostika VAK temelji se na sljedećim laboratorijskim metodama: izdvajanje virusa (VI), dokaz virusne nukleinske kiseline ili virusnog antigena te dokaz protutijela (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.). U slučaju postavljanja sumnje na VAK, koriste se različiti testovi lančane reakcije polimerazom s povratnom transkripcijom (*engl.* reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR) za dokaz nukleinske kiseline VAK za pouzdano potvrđivanje ili isključivanje infekcije. Pri korištenju virološke pretrage, izdvajanja na staničnim kulturama, virus je potrebno dodatno potvrditi RT-PCR testom, virus neutralizacijskim testom (VN-test) ili

imunocitokemijskom metodom, odnosno neizravnom imunofluorescencijom ili imunohistološkom metodom (LU i sur., 2008.; CAROSSINO i sur., 2016.; OIE, 2018.).

Uzorci koji se uzimaju i dostavljaju za laboratorijsku pretragu na VAK ovise o kliničkoj slici odnosno radi li se o respiratornim kliničkim znakovima, pobačaju, sumnji na kliconoštvo u pastuha ili uginuloj životinji. Kod akutne infekcije u odraslih konja i ždrijebadi za uzorak se uzima: obrisak nazofarinksa ili obrisak (moguće i ispirak) nosa, obrisak konjunktive, puna krv (uz etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) ili citrat) i uzorci parnih seruma (u razmaku od 21-28 dana) (BALASURIYA, 2014.).

Puna krv prikupljena u epruvetama s heparinom nije prikladna za laboratorijsko pretragu na VAK ukoliko se želi načiniti virološka pretraga izdvajanjem virusa na staničnim kulturama zbog inhibicijskog učinka na virus. U uginulih životinja za uzorak se uzimaju pluća, slezena i tkivo limfnih organa (timus, mezenterijalni i bronhijalni limfni čvorovi). U slučaju pobačaja u kobila za uzorak je prikladno uzeti posteljicu, plodne tekućine, pluća, slezenu i uzorke tkiva limfnih organa pobačenog ploda. Za potvrđivanje ili isključivanje sumnje na kliconoštvo u pastuha za uzorak je potrebno uzeti sjeme i krvni serum (BALASURIYA, 2014.; OIE, 2018.). Početna identifikacija pastuha kliconoše radi se pomoću dokaza neutralizirajućih protutijela u njihovom krvnom serumu (serološki pozitivnim se smatra rezultat VN-testa s potvrđenim titrom protutijela  $\geq 1:4$ ) (OIE, 2018.), a potvrđena infekcija EAV se utvrđuje bilo izdvajanjem virusa iz sjemena, pokusnim pripuštanjem dvije seronegativne kobile (gdje serokonverzija unutar 28 dana nakon pripuštanja pokazuje da je u sjemenu prisutan EAV) ili dokazom virusne nukleinske kiseline u sjemenu (BALASURIYA i sur., 2016.a). Uzorci sjemena dostavljeni na virološku pretragu trebaju sadržavati frakciju ejakulata bogatu spermom (TIMONEY i sur., 1986.; TIMONEY i sur., 1987. BALASURIYA i sur., 2016.a).

Osim odabira ciljnih organa za uzorkovanje, iznimno je važno uzorke čuvati kontinuirano na temperaturi od 4<sup>0</sup> C i dostaviti u što kraćem roku u laboratorij što se posebno odnosi na pretraživanje izdvajanjem virusa na staničnoj kulturi. Tkiva (npr. timus, posteljica, pluća, jetra, limfni čvorovi) pobačenog ploda ili uginule životinje mogu se staviti u 10% puferirani formalin u svrhu histopatološke i pretrage imunohistokemijskom metodom (BALASURIYA, 2014.).

U cilju određivanja standarda na svjetskoj razini za stavljanje u promet živih kopitara određeni su minimalni standardi od strane OIE-a. Standardi za koje nema pravila u EU zakonodavstvu zamjenjuju se standardima OIE-a. U trendu globalizacije, zdravstvene mjere imaju sve veću važnost u cilju osiguravanja međunarodne trgovine životinja i proizvoda životinjskog podrijetla. U svjetlu toga, Sporazum o primjeni sanitarnih i fitosanitarnih mjera (SPS sporazum) potiče članove Svjetske trgovinske organizacije (*engl.* World Trade Organization - WTO) da temelje mjere na međunarodnim standardima, smjernicama i preporukama. Kako se OIE standardi koji se odnose na zdravlje životinja i zoonoze preuzimaju od strane WTO, opće su prihvaćeni VI i VNT kao standardni i mjerodavni testovi za dijagnostiku VAK (OIE, 2018).

### **2.8.1. Metode dijagnostike VAK dokazom uzročnika ili njegove nukleinske kiseline**

Dokaz EAV u cilju postavljanja dijagnoze može se provesti na dva osnovna načina: izdvajanjem virusa koristeći linijsku staničnu kulturu RK-13 i dokazom njegove nukleinske kiseline molekularnom metodom RT-PCR ili lančane reakcije polimerazom s prethodnim prepisivanjem u stvarnom vremenu (*engl.* real time RT-PCR). Navedene metode su odgovarajuće za potvrđivanje i za isključivanje bolesti.

### **2.8.1.1. Izdvajanje uzročnika na staničnoj kulturi**

Kod postavljanja sumnje u svrhu potvrđivanja VAK dokazom uzročnika izdvajanjem na staničnoj kulturi, za uzorak se uzima obrisak nazofarinksa ili dubokog dijela nosne sluznice konja, kod kliničkih znakova konjunktivitisa obrisak spojnice, puna krv te ejakulat u pastuha u slučaju sumnje na kliconoštvo (OIE, 2018.). Uzorci se u akutnom tijeku bolesti uzimaju odmah nakon pojave povišene temperature u životinje. Štapići za uzimanje obrisaka ne smiju biti drveni (zbog moguće interakcije konzervansa s PCR reakcijom), a radi uspješne provedbe izdvajanja virusa brisevi moraju biti upućeni u laboratorij u transportnom mediju. Kod pobačaja za uzorak se uzima posteljica, pobačeni fetus te limfni čvorovi, pluća, jetra, slezena avitalne ždrebadi uginule po ždrebljenju (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; OIE, 2018.).

U svom radu TIMONEY i McCOLLUM (1993.) navode da iako u slučajevima prirodnih infekcije EAV izdvajanje uzročnika nije uvijek uspješno, izdvajanje virusa uvijek treba pokušati napraviti iz kliničkih uzoraka ili uzoraka tkiva na linijskim ili primarnim kulturama stanica bubrega kunića, konja ili majmuna. Navedene linijske stanične kulture RK-13 (ATCC CCL-37), LLC-MK<sub>2</sub> (ATCC CCL-7) kao i primarne stanične kulture bubrega konja ili kunića mogu se koristiti, s time da se izdvajanje uzročnika na linijskoj staničnoj kulturi RK-13 smatra zlatnim standardom i metodom izbora (TIMONEY i sur., 2004.; OIE 2018.).

Nadalje, OIE (2018.) navodi se da je iskustvo pokazalo da primarno izdvajanje EAV iz sjemena može biti izazovnije nego izdvajanje virusa iz drugih uzoraka, osim ukoliko se koristi odgovarajuća stanična kultura. Pokazalo se da nekoliko čimbenika utječe na primarno izdvajanje EAV iz sjemena na linijskim staničnim kulturama RK-13 (OIE, 2018.). Veći postotak uspješnih izdvajanja postignut je upotrebom tri do pet dana starih

staničnih kultura u punom sloju, korištenjem veće količine inokuluma u odnosu na uobičajeni za površinu boce za uzgoj staničnih kultura ili površinu jažica polistirenskih ploča, i kao najvažnije, dodavanje karboksimetil celuloze (srednje viskoznosti, 400–800 centipaskalsekundi (cPs)) u količini koja prekriva medij (OIE, 2018.).

Inokulirane kulture svakodnevno se prate u svrhu utvrđivanja citopatskog učinka (CPU), koji je obično vidljiv u roku od dva do šest dana. U nedostatku vidljivog CPU, supernatant stanične kulture bi trebalo subinokulirati u novu bocu koja je potpuno prekrivena staničnom kulturom nakon četiri do sedam dana (OIE, 2018.). Ovaj postupak se ponavlja i do pet puta jer je većina izdvajanja EAV uspješna u prvoj pasaži, ali manji broj je *in vitro* vidljiv tek na drugoj ili sljedećim pasažama (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; OIE 2018.). Važno je znati da je većina linijskih staničnih kultura RK-13, uključujući ATCC CCL-37, kontaminirana virusom virusnog proljeva goveda (BVD), čija prisutnost pojačava osjetljivost linijskih staničnih kultura za primarnu izolaciju EAV, posebno iz sjemena (OIE, 2018.).

S obzirom na navedeno važno je i nakon uspješnog izdvajanja EAV, dodatno potvrditi izdvajanje virusa testom neutralizacije, neizravnom imunofluorescencijom ili imunohistokemijski (BALASURIYA i MACLACHLAN, 2014.).

#### **2.8.1.2. Izdvajanje virusa iz sjemena i dokaz kliconoštva**

Dokazano je da pastusi kliconoše kratkotrajno ili dugotrajno izlučuju EAV sjemenom, ali ne postoje dokazi da virus izlučuju respiratornim putem ili putem mokraćne, niti je virus dokazan u trombocitno - leukocitnom međusloju (*eng.:Buffy coat*) u takvih životinja (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; OIE, 2018.).

U pastuha koji su serološki pozitivni na EAV, odnosno kad im je titar protutijela VN-testom  $\geq 1:4$ , treba pokušati izdvojiti virus iz sjemena u svrhu isključivanja kliconoštva.

Jedina iznimka mogu biti pojedine životinje koje su pouzdano i redovito cijepljene uz uvjete da su prije početka provođenja cijepljenja bili serološki negativni na VAK. Također, ako serološki status pastuha donora sjemena i prethodna povijest cijepljenja nije poznata, prilikom stavljanja u promet sjemena, potrebno je načiniti izdvajanje virusa iz sjemena i pretraživanje molekularnom metodom s obzirom na nedostatnu osjetljivost virološke metode. Uz to obvezno je provođenje pretraživanja na način da se uzimaju najmanje dva uzorka ejakulata koja se mogu prikupiti istog dana, tijekom uzastopnih dana ili nakon razmaka od nekoliko dana ili tjedana. Ovakva raznolikost u dopuštenim intervalima uzorkovanja osniva se na izostanku znanstvenih dokaza da učestalost uzorkovanja, interval između sakupljanja ili doba godine kada se uzimaju uzorci utječu na ishod rezultata dokaza virusa u ejakulatu pastuha. GLASER i sur. (1997.) u svom radu opisuju postupak uzimanja uzorka sjemena kao i način postupanja te navode da uzorak prikladan za dokaz virusa iz sjemena pastuha može biti prikupljen pomoću umjetne rodnice, kondoma ili fantomske kobile. Nadalje, prilikom samog postupka prikupljanja sjemena, važno je osigurati da se tijekom čišćenja vanjskog spolovila pastuha ne koriste antiseptici odnosno dezinficijensi. Uzorci bi trebali sadržavati frakciju ejakulata bogatu spermom (druga frakcija) jer virus nije prisutan u prvoj frakciji ejakulata (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). Neposredno nakon sakupljanja, sjeme treba pohraniti u hladnjak na 4 °C ukoliko će uzorak biti dostavljen unutar 24 sata ili pri -20 °C ili po mogućnosti nižoj temperaturi ukoliko će uzorak biti dostavljen nakon više od 24 sata. Zamrzavanje uzorka ne remeti značajno izdvajanja virusa iz sjemena (GLASER i sur., 1997.; OIE, 2018.). U posebnim slučajevima kada izdvajanjem virusa ili RT-PCR testom nije moguće utvrditi status pastuha u odnosu na moguće kliconoštvo, pastuh se može testirati na način

da se pripusti na dvije seronegativne kobile, koje se provjeravaju radi serokonverzije na virus do 28 dana nakon pripusta (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; OIE, 2018.).

Također u slučaju tretiranja pastuha antagonistom gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) ili davanja GnRH radi modifikacije reproduktivne aktivnosti ili ponašanja, nije moguće sa sigurnošću utvrditi status kliconoštva u pastuha jer navedeno može rezultirati privremenim prekidom izlučivanja virusa putem sjemena (OIE, 2018.).

BALASURIYA i sur. (2016.a) u svom radu navode da je izdvajanje virusa zlatni standard za utvrđivanje EAV u sjemenu i metoda koja je preporučena od strane OIE-a za međunarodni promet, ali isto tako da postoje radovi koji navode da molekularne metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom s prethodnim prepisivanjem u stvarnom vremenu (engl. real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction - RT-qPCR) i RT-PCR imaju jednaku ili veću osjetljivost u usporedbi s izdvajanjem EAV iz sjemena (BALASURIYA i sur., 2002.b; LU i sur., 2008.; MISZCZAK i sur., 2011.; CAROSSINO i sur., 2016.).

### **2.8.1.3. Dokaz antigena imunohistokemijskom metodom**

Antigen virusa arteritisa konja može se identificirati u različitim tkivima zaraženih životinja bilo kod vidljivih promjena ili bez lezija tkiva (DEL PIERO, 2000.; OIE, 2018.).

Antigen je moguće dokazati u plućima, srcu, jetri i slezeni i posteljici pobačenih fetusa (DEL PIERO, 2000.). Virusni antigen može se utvrditi unutar citoplazme zaraženih stanica imunofluorescencijom pomoću konjugiranog konjskog poliklonskog anti VAK seruma ili ABC tehnikom, koristeći mišja monoklonska protutijela (Mabs) za GP5 ili N proteine virusa (DEL PIERO, 2000.; OIE, 2018.). Imunohistokemijska metoda se može



koristi kao dijagnostička metoda za VAK u uzorcima kože uzetim tijekom akutne faze infekcije ali nije pouzdana kao metoda za dijagnostiku VAK.

### **2.8.2. Molekularne metode dijagnostike**

Standardni RT-PCR u dva koraka, RT-PCR u jednom koraku, ugnježđeni RT-PCR (RT-nPCR) i RT-qPCR postali su opće prihvaćeni kao alternativa ili dodatak izdvajanju virusa u staničnoj kulturi za potvrdu EAV u kliničkim uzorcima (OIE, 2018.). Dijagnostika temeljena na molekularnim metodama omogućava identificiranje RNK u kliničkim uzorcima, nazofaringealnim ili nosnim brisevima, trombocitno-leukocitnom međusloju, sjemenu i urinu te u različitim uzorcima tkiva (GILBERT i sur., 1997.; BALASURIYA i sur., 2002.b; WESTCOTT i sur., 2003.; LU sur., 2007.; MISZCZAK i sur., 2011.). U usporedbi s tradicionalnim izdvajanjem virusa, ovi testovi temeljeni na RT-PCR-u su osjetljiviji, nije im potreban živi virus i znatno su brži za izvođenje, a u pravilu je potrebno manje od 24 sata do dobivanja rezultata što je izuzetno važno u kliničkoj dijagnostici te su u konačnici i jeftiniji (GO, 2011.a.; OIE, 2018.).

Postoje značajne razlike u osjetljivosti i specifičnosti između različitih izvedbi molekularne dijagnostike koji primarno uključuju različite parove početnica koji ciljaju različite dijelove genoma (u pravilu ORF-ove). Rezultati koji se mogu usporediti s metodom izdvajanja virusa dobiveni su s nekim molekularnim metodama odnosno standardnim RT-PCR u jednom koraku, RT-PCR u dva koraka, ili RT-qPCR (BALASURIYA i sur., 2002.b; GILBERT, TIMONEY i sur., 1997.; LU i sur., 2008.; MISZCZAK i sur., 2011.). Metoda RT-qPCR za VAK je jednostavna, brz i pouzdan način za utvrđivanje i identifikaciju virusne nukleinske kiseline u sjemenu i uzorcima tkiva kao i inokuliranim staničnim kulturama (GILBERT i sur., 1997.; BALASURIYA i sur., 2002.b; LU i sur., 2008.; MISZCZAK i sur., 2011.). Međutim, postoje dokazi koji

upućuju da izbor komercijalnog kompleta koji se koristi za ekstrakciju i umnažanje nukleinske kiseline može imati veliki utjecaj na samu metodu i njenu osjetljivost (MISZCZAK i sur., 2011.). To je demonstrirano metodom ekstrakcije nukleinske kiseline korištenjem magnetskih zrnaca u kombinaciji sa specifičnim komercijalnim RT-PCR kompletima. RT-PCR u jednom koraku ima važne prednosti u odnosu na standardni RT-PCR u dva koraka jer uklanjanje mogućnosti križne kontaminacije između uzoraka s obzirom da se epruveta za uzorke nikada ne otvara te smanjuje vjerojatnost lažno pozitivne reakcije kod dokazivanja umnoženog odsječka RT-PCR pomoću proba specifičnih za sekvencu. Međutim, u slučaju nedostatnih ili neodgovarajućih biosigurnosnih mjera u laboratoriju, i dalje postoji mogućnost križne kontaminacije između uzoraka, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Dijagnostika RT-nPCR metodom je visoko osjetljiva za utvrđivanje EAV, ali se isto tako njenom provedbom povećava vjerojatnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata. Rizik od križne kontaminacije korištenjem RT-nPCR povećan je zbog drugog koraka PCR umnažanja koji uključuje proizvod iz prve RT-PCR reakcije. Da bi se smanjio rizik od moguće križne kontaminacije, treba poduzeti sve mjere opreza, posebno tijekom ekstrakcije RNK i pripreme reakcije. U svrhu provjere postupaka i rezultata testa potrebno je imati pozitivne i negativne kontrole za EAV, i kada je moguće u svakom RT-PCR testu treba uključiti nukleinsku kiselinu ekstrahiranu iz medija stanične kulture slobodne od EAV. S obzirom na navedeno u većini slučajeva će se upotrebom RT-PCR-a u jednom koraku ili RT-qPCR-a u velikoj mjeri zaobići problemi povezani s križnom kontaminacijom. U nedostatku općenite suglasnosti o univerzalnom setu početnica za EAV kao i nedostatku suglasnosti o optimalnoj metodi, postoji potreba za provođenjem metode izdvajanja

virusa zajedno s molekularnim metodama za identifikaciju virusa u kliničkim ili *post mortem* uzorcima te tamo gdje je moguće, genomska i fenotipska analiza virusnih izolata. Sojevi EAV izolirani iz različitih regija svijeta klasificirani su u različite filogenetske skupine analizom nukleotidnog slijeda gena koji kodiraju proteine GP3, GP5 i M (ORF 3, 5 i 6) i nukleokapsidni (N) gen (ORF 7) (ZHANG i sur., 2010.b). Većina autora smatra da je određivanje nukleotidnog slijeda ORF 3 i ORF 5 regije najkorisniji i najpouzdaniji u svrhu filogenetske analize. Određivanje rezultata filogenetske analize potiče se jer su oni osnova molekularne epizootiologije i najpouzdaniji način praćenja širenja EAV (ZHANG i sur., 2010.b).

### **2.8.3. Serološke metode dijagnostike**

U skladu s OIE Dijagnostičkim priručnikom za kopnene životinje (OIE, 2018.) postoje razne serološke metode dijagnostike koje se koriste za dokaz protutijela na EAV, kao što su: VN-test, reakcija vezanja komplementa (RVK), neizravna imunofluorescencija, imunodifuzija u gelu, ELISA i imunokemijski test s mikročesticama (*engl.* fluorescent microsphere immunoassay - MIA). Reakcija vezanja komplementa je manje osjetljiva od VN-testa i ELISA-e, ali se može koristiti za dijagnosticiranje nedavne infekcije (OIE, 2018.). Bez obzira na navedene moguće metode serološke dijagnostike s obzirom na svrhu pretraživanja te specifičnost i osjetljivost testova u cilju dobivanja pouzdanih rezultata u dijagnostici VAK najviše se koriste VN-test i ELISA test.

#### **2.8.3.1. Virus neutralizacijski test**

Virus neutralizacijski test za VAK je serološka metoda dijagnostike koja se koristi za određivanje titra neutralizacijskih protutijela za EAV prisutnih u uzorku seruma. Neutralizacijska protutijela traju nekoliko godina nakon prirodne infekcije ili cijepljenja

s modificiranim živim cjepivom protiv VAK (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). VN-test se smatra zlatnim standardom koji je određen od strane OIE-a za određivanje protutijela na EAV (OIE, 2018.). S obzirom na navedeno, VN-test je određen od OIE-a i kao službena dijagnostička metoda za međunarodni promet živim životinjama i sjemenom pastuha. Ono što se pokazalo otežavajućim pri izvedbi VN-testa je dugotrajnost postupka i nemogućnost razlikovanja protutijela koja su nastala prirodnom infekcijom od protutijela nastalih kao posljedica cijepljenja. Također, pri izvođenju VN-testa treba paziti na mogućnost pojave serumske citotoksičnosti s obzirom na korištenje stanične kulture RK-13, koja se koristi pri izvođenju testa (OIE, 2018.; BANNAI i sur., 2018.). Citotoksičnost se može zamijeniti s virusnim citopatogenim učinkom što dovodi do poteškoća u tumačenju rezultata pretrage (NEWTON i sur., 2004.). Rezultati istraživanja i podaci prikupljeni s terena ukazuju na to da je navedena serumska citotoksičnost povezana s uporabom inaktiviranog cjepiva protiv alfaherpesvirusa konja, dobivenog iz stanične kulture, a pretpostavlja se da nastaje kao učinak protutijela nastalih cijepljenjem na staničnu kulturu RK-13 (NEWTON i sur., 2004.; BANNAI i sur., 2018.).

### **2.8.3.2. Imunoenzimni test (ELISA)**

ELISA je serološka metoda dijagnostike koja se koristi za određivanje specifičnih protutijela za EAV prisutnih u uzorku seruma kopitara (KONDO i sur. 1998; NUGENT i sur., 2000.; DUTHIE i sur., 2008.).

Trenutno postoji nekoliko dostupnih komercijalnih ELISA kompleta za serološku dijagnostiku VAK koje su izrađene na principu kompetitivne ELISE poput kompleta Equine Arteritis Virus cELISA (engl. competitive-enzyme linked immunosorbent assay) (VMRD Inc., Pullman, WA, SAD) (BANNAI i sur., 2018.) ili indirektna ELISA kao ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (IDvet Genetics, Grabels, Francuska)

(LEGRAND i sur. 2009.) te INgezim Arteritis 2.0 (Ingenasa, Madrid, Španjolska) (DUTHIE i sur., 2008.).

U istraživanju PFAHL i sur. (2016.) uspoređene su dvije verzije kompetitivne ELISA istog proizvođača (VMRD Inc., Pullman, WA, SAD) te je utvrđeno da je poboljšana verzija znatno osjetljivija nego izvorna cELISA. Ustanovljeno je da je u novoj verziji dijagnostičkog kompleta poboljšana osjetljivost bez smanjenja specifičnosti testa (CHUNG i sur., 2015.). Između ostalog i temeljem navedenog istraživanja, smatra se da korištenje cELISA-e u dijagnostici VAK u usporedbi s VN-test-om, ima određene prednosti kao što je kraće vremensko razdoblje koje je potrebno za dobivanje rezultata pretraživanja s obzirom da je za izvođenje VN-testa potrebno 72 sata, a rezultati cELISA-e dobiju se u jednom danu. Također prednošću se smatra i jednostavnije izvođenje postupka s obzirom da postoje standardni kompleti koji umanjuju mogućnosti varijacije rezultata kao posljedicu izvođenja metode u različitim laboratorijima. Također, s obzirom da se kod cELISA-e koristi pročišćeni antigen, u postupku izvođenja iste nisu potrebni posebni biosigurnosni uvjeti za onemogućavanje širenja živog virusa kao tijekom izvođenja VN-testa (PFAHL i sur., 2016.).

BANNAI i sur. (2018.) u svojem radu posebno ističu da mogućnosti dijagnostike s ELISA kompletom nisu u potpunosti istražene za pojedine slučajeve niti su u potpunosti validirani iako je prema dostupnim podacima validirana cELISA (VMRD, Pullman, WA) pokazala visoku osjetljivost i specifičnost i u usporedbi s VN-testom. Kao prednost ELISA metode ističe se i primjena u slučaju citotoksičnosti seruma kao i moguća primjena za provjeru statusa konja nakon prethodnog pretraživanja VN-testom s obzirom na postizanje brzih rezultata i značajno manje zahtjevno izvođenje metode (DUTHIE i sur., 2008.).

Međutim, bez obzira na navedene prednosti u izvođenju serološke metode dijagnostike komercijalnim ELISA metodama, temeljni nedostatak je nemogućnost utvrđivanja titra protutijela kao i nedostatno istražena specifičnost i osjetljivost u različitim epizootiološkim prilikama. Zajednički nedostatak svih seroloških metoda koje se danas primjenjuju u dijagnostici VAK ostaje razlučivanje cjepnih protutijela od onih nastalih kao posljedica infekcije zbog čega se u serološki pozitivnih pastuha ili u slučaju kliničkog očitovanja bolesti serološka dijagnostika nadopunjava izdvajanjem virusa i/ili molekularnom dijagnostikom.

## **2.9. Liječenje**

Ne postoji etiološko liječenje VAK odnosno nema specifičnog antivirusnog liječenja konja zaraženih EAV već se u slučaju pojave teže kliničke slike u zaraženih jedinki primjenjuje simptomatska terapija uz primjenu nesteroidnih protuupalnih lijekova, antipiretika, diuretika i primjena obloga odnosno povoja za smanjenje edema (GLASER i sur., 1996.; BALASURIYA, 2014.).

Bolesne životinje je potrebno izolirati, poštedjeti od treninga ili aktivnosti, omogućiti im potpuni odmor i pružiti im pojačanu njegu. Dosadašnje iskustvo u liječenju VAK je pokazalo da ne postoji učinkovita terapija u liječenju ždrjebadi s intersticijskom upalom pluća ili pneumoenteritisom kao posljedicom VAK, osim primjene antibiotika u svrhu zaštite i liječenja sekundarnih bakterijskih infekcija (BALASURIYA, 2014.).

Neke studije podupiru tezu da antagonisti Gn-RH ili anti-Gn-RH pripravci mogu privremeno ograničiti izlučivanje virusa u sjemenu pastuha kliconoše (BALASURIYA i sur., 2013.; FORTIER i sur., 2002.). Mogućnosti privremenog zaustavljanja proizvodnje testosterona u pastuha kliconoše budi nadu u nalaženje terapije koja bi dovela do uklanjanja virusa i potpunog izlječenja (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; GLASER i

sur., 1996.; BALASURIYA, 2014.). U ograničenoj studiji BURGER i sur. (2006.) demonstrirali su rezultate tretiranja pastuha kliconoše s anti-Gn-RH pripravkom nakon kojega je došlo do prestanka izlučivanja EAV u sjemenu kroz određeno vrijeme. Međutim, nakon provedenog tretmana svi tretirani pastusi su imali smanjen libido, smanjeni skrotum, manji broj spermija, manji postotak normalnih spermija i slabiju pokretljivost spermija. S obzirom na navedene nuspojave i dugotrajne učinke, do sada nije poznat način liječenja pastuha kliconoše koji bi doveo do prestanka izlučivanja virusa putem sjemena osim kirurške kastracije pastuha, čime se u konačnici gubi rasplodna vrijednost pastuha (BALASURIYA i sur., 2016.a).

Pokazano je da peptidno-konjugirani fosforodiamidatni morfolino oligomer (PPMO) koji cilja GP5 gen, genomski 5' kraj VAK, sposoban izliječiti HeLa stanice trajno zaražene EAV-om u *in vitro* uvjetima (ZHANG i sur., 2010.a). Međutim, *in vivo* primjena PPMO-a i drugih antivirusnih lijekova je ograničena uzimajući u obzir troškove i broj konja koje je potrebno liječiti (BALASURIYA, 2014.).

## 2.10. Cijepljenje

Trenutno postoje dva dostupna komercijalna cjepiva protiv VAK dobivena uzgojem virusa na staničnoj kulturi (OIE, 2018.). Jedno je modificirano, živo virusno cjepivo, pripremljeno od virusa koji je oslabljen višestrukim serijskim pasažama u primarnim stanicama bubrega konja i kunića te u staničnoj kulturi kože konja (OIE, 2018.). Pokazalo se da kod primarne aplikacije modificiranog cjepiva, isto štiti od kliničke slike bolesti ali ne sprječava u potpunosti infekciju s EAV (ZHANG i sur., 2012.).

Dokazano je da je cjepivo sigurno za primjenu u pastuha i kobila koje nisu gravidne. Ne preporučuje se cijepljenje ždrjebadi mlađe od šest mjeseci i gravidnih kobila, a posebno ne u posljednja dva mjeseca gravidnosti (BROADDUS i sur., 2011b.). Ne postoje radovi

koji su dokazali infekciju uzrokovanu cjepnim sojem ili da je došlo do rekombinacije s prirodnim sojevima EAV nakon primjene cjepiva na terenu (OIE, 2018.). Međutim, u nekim radovima je dokazano da se virus iz cjepiva mogao sporadično izdvojiti iz obriska nazofarinksa i trombocitno-leukocitnog međusloja, obično oko sedmog dana, rijetko do 32. dana nakon cijepjenja (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.; BALASURIYA, 2014.). Cijepljeni pastusi uglavnom ne izlučuju virus ni u sjemenu ni mokraćom, međutim, zabilježena je vrlo niska razina virusa u sjemenu cijepljenog pastuha, četvrtog i šestog dana nakon cijepjenja (SUMMERS-LAWYER i sur., 2011.; BALASURIYA, 2014.). S obzirom na navedeno ne preporučuje se parenje ili uzimanje sjemena od pastuha koji su prvi puta cijepljeni ukoliko nije prošlo 28 dana od dana cijepjenja. Navedeno cjepivo je odobreno za uporabu u SAD-u i Kanadi u svrhu preventivnog cijepjenja protiv VAK i koristilo se pod kontrolom nadležnog tijela u Argentini i na Novom Zelandu (BALASURIYA, 2014.).

Drugo cjepivo je inaktivirano cjepivo s adjuvansom napravljeno od virusa uzgajanog na staničnoj kulturi i načelno nema ograničenja u primijeni. S obzirom da nema dostatno odgovarajućih podataka, cjepivo se ipak trenutno ne preporučuje za cijepljenje gravidnih kobilica (OIE, 2018.). Odobreno je za uporabu u određenim europskim zemljama, uključujući Dansku, Francusku, Njemačku, Mađarsku, Irsku, Švedsku i Veliku Britaniju (OIE, 2018.). Iako ovo cjepivo inducira stvaranje neutralizirajućih protutijela, njegova učinkovitost u prevenciji VAK i kliconoštva u pastuha znatno je slabija nego kod modificiranog, živog cjepiva (BALASURIYA i sur., 2016.a).

## **2.11. Mjere kontrole i iskorjenjivanja VAK-a**

Mjere kontrole i prevencije virusnog arteritisa konja prvenstveno su usmjerene u identifikaciju pastuha kliconoše i mjere sprječavanja unosa EAV u prijemljivu populaciju



(GLASER i sur., 1997.). Svjetska organizacija za zdravlje životinja odredila je standarde za minimalne mjere kontrole i prevencije u populaciji konja (OIE, 2018.; OIE, 2021.), a koriste se na nacionalnoj razini i kod uvoza ili stavljanja u promet kopitara i sjemena. U svrhu osiguravanja razvoja uzgoja kopitara, povećanja produktivnosti sektora konjogojstva i poticanja prometa, na razini Europske unije, 2009. godine određena su pravila kojima se uređuje premještanje kopitara između država članica EU i uvoza kopitara iz trećih zemalja (ANONIMNO, 1990.; ANONIMNO, 1995.; ANONIMNO, 2009.d). Mjere koje se odnose na VAK određuju veterinarsko-zdravstvene uvjete za uvoz kopitara iz trećih zemalja i omogućuju državama članicama provođenje nacionalnih programa kontrole VAK. Uvoz kopitara u državu članicu odobravao se samo iz onih trećih zemalja koje su bile uvrštene na popis država i njihovih područja određenih od strane Europske komisije. Također je bilo određeno da za uvoz u državu članicu u svrhu sprječavanja širenja VAK-a, pastusi moraju biti pretraženi sa serološki negativnim rezultatom ili biti negativni metodom izdvajanja virusa ili bilo kojim drugim testom priznatim u skladu s posebnim postupkom Europske komisije.

Ukoliko su pojedine države provodile nacionalne programe kontrole ili primjenjivale smjernice OIE-a za premještanje kopitara između država, pojedine države bi primjenjivale određena pravila i na nacionalni promet, ovisno o epizootiološkoj situaciji i ukoliko bi strategija bila prepoznata na nacionalnoj razini i usmjerena u zaštitu konjogojstva.

Određene europske zemlje; Ujedinjeno Kraljevstvo (UK), Irska, Njemačka, Francuska i Italija uspostavile su Kodeks prakse u kojem su određene smjernice za kontrolu i prevenciju određenih bolesti kopitara, uključujući i VAK (HBLB, 2021.). Također, dobar primjer sustavne kontrole bolesti ima Novi Zeland koji je i uspio iskorijeniti EAV na

njihovom području (OIE, 2014.). U Sjedinjenim Američkim Državama su propisani minimalni standardi za prevenciju, utvrđivanje i kontrolu VAK, kao i minimalni zahtjevi za nacionalno i međudržavno premještanje konja (USDA-APHIS, 2004.). U Sloveniji je obvezna kontrola na EAV svih seropozitivnih pastuha s rodovnikom, dok se kontrola EAV kod respiratornih kliničkih znakova provodi na dobrovoljnoj osnovi (HOSTNIK i sur., 2011.).

U nadziranju zdravlja kopitara odnosno praćenjem općeg zdravstvenog statusa, osobito pobačaja i drugih reproduktivnih poremećaja moguće je uočiti kliničke (respiratorne kliničke znakove i pobačaje) ili uzgojne pokazatelje (npr. preganjanja i sterilitete zbog rane embrionalne smrtnosti) koji upućuju na pojavu VAK-a u uzgoju (BARBIĆ i sur., 2019.). Kao najveći problem u mjerama kontrole pokazalo se kliconoštvo u pastuha s obzirom da oni najčešće ne pokazuju kliničke znakove, a izlučuju virus u velikoj količini i time predstavljaju rizik za druge kopitare i moguće širenje virusa na velike udaljenosti kod prometovanja takvim životinjama. Zbog navedenog razloga, u nekim državama, kao primjer dobre prakse primjenjuje se pretraživanje pastuha na VAK, prije uvođenja u novo stado, prije sezone pripusta odnosno nacionalnog i međunarodnog prometa. Ciljana kontrola se provodi serološkim pretraživanjem uzoraka krvi metodom virus neutralizacijskog testa (BARBIĆ i sur., 2019.). Titar protutijela  $\geq 1:4$  smatra se pozitivnim u skladu sa smjericama propisanim od strane OIE-a (OIE, 2018.). Radi dokaza kliconoštva pastusi s pozitivnim serološkim nalazom se dodatno pretražuju na način da se najmanje dva uzorka ejakulata pretraže virološkom i/ili molekularnom pretragom. Radi potvrde ili isključenja kliconoštva moraju se pretražiti najmanje dva ejakulata serološki pozitivnog pastuha jer pojedine životinje ne moraju u svakom ejakulatu izlučivati virus nego izlučivanje može biti sporadično (OIE, 2018.). Pastusi koji

su dokazano kliconoše i u takvim uvjetima se mogu koristiti za rasplod, ali pod vrlo strogim uvjetima (TIMONEY i MCCOLLUM 1993.). Takvi se pastusi moraju držati fizički izolirani od drugih kopitara i mogu se pripuštati samo na kobile koje su seropozitivne bilo od prirodne infekcije ili posljedično cijepljenju (TIMONEY i MCCOLLUM 1993.), i to cijepljenju koje je provedeno najmanje tri tjedna prije parenja ili embrio transfera (BROADDUS i sur., 2011.a; BALASURIYA i sur., 2016.a). Međutim, kod takvog korištenja pastuha svakako treba imati na umu i općenitu politiku kontrole VAK u drugim državama s obzirom da vjerojatno neće sve nacionalne politike kontrole bolesti dopustiti uvođenje pastuha potencijalnog kliconoše u uzgoje kao i korištenje serološki pozitivnih pastuha za rasplod (BALASURIYA i sur., 2016.a).

Ako kod serološki pozitivnog pastuha nije moguće doći do uzoraka ejakulata, u cilju utvrđivanja kliconoštva, pastuh se pari s dvije pouzdano serološki negativne kobile koje se ponovno pretražuju nakon 28 dana. Ukoliko i dalje nalaz bude negativan pastuh se smatra serološki pozitivnim, ali ne smatra se izlučivačem (OIE, 2018.; BARBIĆ i sur., 2019.).

Drugi način kontrole bolesti jest imunoprofilaksa. U SAD-u i Kanadi se od 1985. godine koristi oslabljeno, živo cjepivo protiv VAK u svrhu kontrole i mjere prevencije VAK u populaciji konja (BALASURIYA i sur., 2016.a). Međutim kontrola bolesti cijepljenjem se može koristiti isključivo za prevenciju u životinja koje nikada ranije nisu bile inficirane jer se cijepljenjem ne rješava problem kliconoštva (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). Pastuh koji je kliconoša ostaje to i dalje neovisno o cijepljenju te i dalje može izlučivati virus (BALASURIYA i sur., 2016.a). S obzirom na navedeno, jasno je da se cjepivo može koristiti isključivo za prevenciju infekcije u životinja koje nikada ranije nisu bile inficirane. Zbog toga postupak cijepljenja podrazumijeva serološko pretraživanje pastuha

neposredno prije cijepljenja te samo u slučaju negativnog nalaza imamo opravdanje cijepiti pastuha. Osim negativnog nalaza prije cijepljenja, nakon cijepljenja životinja mora obavezno biti četiri tjedna u strogoj karanteni, bez dodira s drugim konjima (izravnog ili preko zajedničkih prostora i predmeta), i tek tada se može smatrati doista zaštićenom od infekcije. Cijepljenje se mora ponavljati ovisno o uputi proizvođača cjepiva odnosno po programu cijepljenja koji svakako mora uključivati početak sezone rasplodivanja.

Svakako treba raditi na novim cjepivima koja će omogućiti razlikovanje cjepnog soja od terenskog po principu DIVA strategije, što bi bio značajan doprinos konjogojstvu i uzgoju kopitara općenito s obzirom da bi se olakšalo premještanje kopitara kao i provođenje programa nadziranja (BALASURIYA i sur, 2016.a).

### **2.11.1. Mjere kontrole u Republici Hrvatskoj**

Na području Republike Hrvatske određena je obveza prijave potvrđenog slučaja VAK od 2004. godine (ANONIMNO, 2004.). Navedena obveza je osiguravala poduzimanje mjera kontrole, prevencije i prikupljanje podataka kao i širenje svijesti o predmetnoj bolesti. Prijava samo potvrđenog slučaja bolesti ostaje na snazi do 2014. godine kada se uvodi i obveza prijave sumnje na bolest (ANONIMNO, 2009.g; ANONIMNO, 2011.e; ANONIMNO, 2011.f; ANONIMNO, 2014.d; ANONIMNO, 2020.c). Sustavno nadziranje VAK na području RH počinje 2009. godine. Iste godine objavljen je „Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja“ (ANONIMNO, 2009.e) te se godišnjom „Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini“ (ANONIMNO, 2009.b; ANONIMNO, 2009.c) po prvi puta propisuje nadziranje VAK-a na način da se svi pastusi koji se koriste za rasplod i sve kobile u slučaju pobačaja pretražuju na VAK. Mjere se u prvoj godini u potpunosti financiraju iz

državnog proračuna što je doprinijelo podizanju svijesti i privoli posjednika da sudjeluju u provedbi mjera. Nadziranje je nastavljeno i tijekom 2010., 2011. i 2012. godine na isti način, ali uzorkovanje i laboratorijske pretrage nisu se financirale iz državnog proračuna osim u slučaju pobačaja. Navedene mjere ostaju na snazi i 2013., 2014., 2015., 2016. i 2017. godine, s time da je dodana preporuka za serološko pretraživanje kobila prije prirodnog pripusta (ANONIMNO, 2009.b; ANONIMNO, 2009.c; ANONIMNO, 2010.b; ANONIMNO, 2010.c; ANONIMNO, 2010.d; ANONIMNO, 2011.b; ANONIMNO, 2011.c; ANONIMNO, 2011.d; ANONIMNO, 2012.b; ANONIMNO, 2012.c; ANONIMNO, 2013.b; ANONIMNO, 2013.c; ANONIMNO, 2014.b; ANONIMNO, 2014.c; ANONIMNO, 2015.b, ANONIMNO, 2016.b; ANONIMNO, 2016.c; ANONIMNO, 2017.b). Mjere ostaju na snazi i tijekom 2018. godine, s time da je dodana obvezna virološka i molekularna pretraga ejakulata pastuha, prije početka korištenja za prirodni pripust ili umjetno osjemenjivanje, a koji su u prethodnom pretraživanju bili seropozitivni (ANONIMNO, 2018.). U 2019. godini se ukidaju sve mjere aktivnog nadziranja i ostaje samo pasivno nadziranje u slučaju pobačaja (ANONIMNO, 2019.). Tijekom 2020. i 2021. godine po prvi puta se provodi aktivno nadziranje u sklopu programa i to nasumičnim uzorkovanjem konja starijih od 12 mjeseci. Broj uzoraka konja koji se pretražuju je određen na način da se sa 95% vjerojatnosti otkrije prisustvo bolesti ukoliko je uzročnik prisutan u 2% ili 5% populacije konja (ANONIMNO, 2020.b; ANONIMNO 2020.d; ANONIMNO, 2021.a; ANONIMNO, 2021.b). Osim aktivnog nadziranja i dalje je ostalo na snazi i pasivno nadziranje VAK-a kod pobačaja ili drugih znakova koji mogu ukazivati na VAK. U dokumentu „Naputak o provođenju mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju“ (ANONIMNO, 2009.f; ANONIMNO,

2010.a; ANONIMNO, 2011.a; ANONIMNO, 2012.a; ANONIMNO, 2013.a; ANONIMNO, 2014.a; ANONIMNO, 2015.a; ANONIMNO, 2016.a; ANONIMNO, 2017.a; ANONIMNO, 2020.a) detaljnije su određivani načini provođenja mjera kontrole zdravlja životinja za pojedine bolesti propisane godišnjom Naredbom, koji se kontinuirano donosio u svrhu tumačenja i određivanja načina provođenja mjera od strane veterinarskih organizacija, veterinarske prakse i veterinarske službe. Bilo je određeno da se uzima uzorak krvi u serumske epruvete i šalje na serološku pretragu, uz popratni obrazac za dostavu uzoraka na laboratorijsko pretraživanje, na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u Laboratorij za virusni arteritis konja (ARTERlab). U navedenom dokumentu je bilo i propisano tumačenje rezultata pretrage na način da se životinja smatra serološki pozitivnom na VAK ukoliko se laboratorijskom pretragom metodom virus neutralizacijskog testa utvrdi titar neutralizacijskih protutijela  $\geq 1:4$ . U slučaju seropozitivnog nalaza postupalo se sukladno „Pravilniku o mjerama kontrole arteritisa konja“ (ANONIMNO, 2009.e). Kako bi se na neki način kontrolirala provedba uzimanja ejakulata pastuha koji su utvrđeni pozitivni, metodom virus neutralizacijskim testom na VAK, bilo je određeno da nadležna ovlaštena veterinarska organizacija mora pismenim putem izvijestiti nadležno tijelo o razlozima nemogućnosti ispunjavanja obveza preuzetih Ugovorom o povjeravanju poslova. Koliko god je navedena obveza ponekad možda zvučala grubo prema kolegama veterinarima, činjenica je da je u stvari navedena odredba bila alat nadležnom tijelu za usmjeravanje potrebnih aktivnosti odnosno organiziranje edukacija tamo gdje je to bilo potrebno.

„Pravilnikom o mjerama kontrole arteritisa konja“ (ANONIMNO, 2009.e) propisano je postupanje u slučaju sumnje i potvrde bolesti u uzgoju. U slučaju sumnje na bolest osim uzimanja uzoraka, provodilo se epidemiološko istraživanje u svrhu prikupljanja

informacija o porijeklu, širenju infekcije unutar uzgoja i na druga gospodarstva kao i procjeni vremenskog perioda koliko je EAV prisutan u uzgoju. Na sumnjivom gospodarstvu određivale su se mjere zabrane prometa i premještanja kopitara, zabrana pripuštanja kopitara, provođenje mjera čišćenja i dezinfekcije u objektima u kojima su se držale životinje. Također u slučaju uginuća, obvezno se lešina neškodljivo uništavala.

Potvrđenim slučajem bolesti smatralo se kada se u krvi pastuha utvrde specifična protutijela za virus uzročnika bolesti, a u sjemenu dokaže prisustvo virusa. U takvim slučajevima pastuh u čijem se sjemenu utvrdio virus morao je biti izlučen iz rasploda. U kobila je VAK bio potvrđen kada se u krvi utvrdila specifična protutijela za virus uzročnika bolesti ili se dokaže prisustvo virusa. U kobile s utvrđenim kliničkim znakovima bolesti, obveza je provođenja dva serološka pretraživanja u razmaku od najmanje 14 dana. Ako se u kobile utvrdi porast titra protutijela, smatra se zaraženom te se zabranjuje pripust dok se titar protutijela ne uravnoteži ili padne. Bilo je određeno da se pretraživanje ponavlja u razmacima od najmanje 14 dana.

Osim navedenog na gospodarstvu odnosno uzgoju na kojem je potvrđen VAK provodile su se i posebne mjere koje je određivao veterinarski inspektor i to: popisivanje i serološko pretraživanje svih kopitara, zabrana pripusta pozitivnih pastuha i njihovo evidentiranje kao izlučivača virusa u farmsku knjigu, uzgojnu knjigu ili drugi identifikacijski dokument pastuha i obvezno isključivanje iz rasploda. Kobile koje bi na dan pripusta pokazivale kliničke znakove bolesti ili su ih pokazivale u razdoblju od tri mjeseca prije pripusta bilo bi zabranjeno pripuštanje. Pastuh koji je dokazano cijepljen protiv VAK-a, mogao se koristiti za rasplod pod uvjetom da je prije prvog cijepljenja pretražen na EAV sa serološki negativnim rezultatom, što je evidentirano u identifikacijski dokument pastuha. Zaraženi kopitari su mogli napuštati gospodarstvo samo radi upućivanja na klanje u

klaonicu. Mjere za zaraženo gospodarstvo su morale ostati na snazi najmanje 28 dana nakon prestanka posljednjih kliničkih znakova bolesti i provođenja svih mjera te provođenja završnog čišćenja i dezinfekcije. U praksi bi mjere znale biti i duže na snazi s obzirom da nije uvijek bilo moguće pravovremeno organizirati uzimanje ejakulata od sumnjivog pastuha. Iako nije bilo propisano „Pravilnikom o mjerama kontrole arteritisa konja“ (ANONIMNO, 2009.e), izlučivanje takvih pastuha kliconoša iz rasploda se provodilo u dogovoru s vlasnicima, najčešće kastracijom, što je omogućilo smanjivanje širenja uzročnika u prijemljivoj populaciji i istovremeno osiguravalo da se takva životinja ne koristi u rasplodu. Također u posebne mjere je bilo svrstano i neškodljivo uništavanje pobačenih fetusa i plodnih ovojnica iako bi se to trebalo smatrati osnovnim mjerama kontrole odnosno biosigurnosti. Kod postavljanja sumnje ili potvrde VAK-a te ukoliko je posjednik poštivao naređene mjere kontrole bolesti i mjere registracije i označavanja te stavljanja u promet, sve naređene mjere su se plaćale iz državnog proračuna čime se ujedno i osiguravala njihova provedba.

Cijepljenje protiv VAK-a nije se provodilo na području Republike Hrvatske. Iako se ponekad nailazilo na životinje čiji su posjednici tvrdili da su cijepljene, ukoliko nisu imale dokaze o prethodnom negativnom statusu i karanteni takve se životinje nisu smatrale cijepljenima.



### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog svojih značajki VAK je uzgojno i gospodarski jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti kopitara u svijetu. Izazovi u nadzoru ove bolesti su vezani uz dijagnostiku, varijabilnu, nerijetko asimptomatsku kliničku sliku, moguće trajno kliconoštvo te značajna ograničenja u uspješnoj provedbi cijepljenja. Stoga se bolest suzbija na različite načine u različitim državama prilagođavajući program nadzora i suzbijanja epizootiološkim značajkama konjogojstva pojedine države kao i načinu držanja i korištenja kopitara.

U Republici Hrvatskoj prva potvrda cirkulacije EAV datira iz 2005. godine, a od 2009. godine se provodi program nadzora i suzbijanja bolesti. Epizootiološke značajke VAK na području RH nisu istraživane te se u ovoj disertaciji opisuje kretanje seroprevalencije VAK na području RH u razdoblju od 2009. do 2015. godine. Kroz analizu podataka određuju se epizootiološke značajke pojave infekcija EAV u specifičnim epizootiološkim prilikama konjogojstva RH. Dodatno, analizom navedenih podataka u istraživanom razdoblju te usporedbom s dostupnim podacima o broju kopitara na području RH istražiti će se opseg provedbe mjera nadzora i suzbijanja ove bolesti na području RH. Postignuti rezultati predstavljaju osnovu za prosudbu provedenih mjera kao i značajnu smjernicu za određivanje opsega i načina provedbe mjera u budućnosti.

Poteškoću u nadzoru VAK predstavlja i serološka dijagnostika za koju se zlatnim standardom smatra VN-test. Kako je ova metoda zahtjevna za izvođenje, podrazumijeva rad sa staničnim kulturama i infektivnim virusom te dobro opremljene laboratorije i visoko kvalificirane djelatnike, nerijetko se u serološkoj dijagnostici koristi ELISA. Iako

je ova metoda značajno lakša za izvođenje, ne zahtjeva posebne uvjete i omogućava pretraživanje velikog broja uzoraka u značajno kraćem vremenu, mogućnost njenog korištenja u rutinskoj dijagnostici potrebno je validirati u realnim uvjetima konjogojstva RH. Stoga je u ovom istraživanju načinjeno istraživanje specifičnosti i osjetljivosti komercijalno dostupnih imunoenzimnih kompleta, temeljem usporedbe s rezultatima VN-testa, kako bi se odredila mogućnost i pouzdanost primjene ovakve dijagnostike u epizootioškim prilikama RH.

Virus VAK je serološki jedinstven, ali prema genskoj varijabilnosti svrstava se najčešće u sjeverno američke i europske sojeve koji se dodatno dijele u europsku podgrupu 1 i europsku podgrupu 2. Ova genska heterolognost je značajna jer je dokazano da se klinički ishod infekcije razlikuje ovisno, među ostalim, i o soju virusa. Stoga će se iz arhivskih uzoraka načiniti molekularna tipizacija kako bi se odredili sojevi koji cirkuliraju na području RH. Kroz tipizaciju terenskih sojeva dobit će se izvorni podaci o međusobnoj srodnosti sojeva EAV koji cirkuliraju na području RH što predstavlja značajne podatke za molekularnu epizootiologiju bolesti u specifičnim prilikama konjogojstva na području RH.

Cjelovito provedeno istraživanje rezultirati će objektivnim znanstveno utemeljenim izvornim spoznajama o epizootiologiji VAK na području RH kao i prosudbom opsega provedbe i rezultata provedbe programa nadzora i suzbijanja ove bolesti. Također, odrediti će se mogućnost i ograničenja serološke dijagnostike komercijalno dostupnim imunoenzimnim kompletima (ELISA) u specifičnim epizootioškim uvjetima konjogojstva RH. Uz dodatne spoznaje postignute molekularnom tipizacijom uzročnika, cjeloviti rezultati disertacije će osim znanstvenog doprinosa poznavanju VAK na

globalnoj razini pružiti mogućnost prosudbe dosadašnjeg provođenja mjera nadzora i suzbijanja na području RH kao i dati jasne smjernice za provedbu programa u budućnosti.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1 Arhivski podaci o serološkom pretraživanju konja na virusni arteritis konja**

U arhivi Laboratorija za virusni arteritis konja – ARTER.lab uzeti su svi obrasci koji su u razdoblju od 2009. do 2015. godine zaprimljeni u Laboratorij uz dostavljene uzorke seruma/pune krvi kopitara za pretraživanje na virusni arteritis konja.

Sveukupno je u istraživanom razdoblju za serološko pretraživanje na virusni arteritis konja dostavljeno 5782 uzorka seruma kopitara s područja cijele Republike Hrvatske.

Najveći broj uzoraka dostavljen je 2009. godine, sveukupno 1070. Međutim 2009. godine se u laboratoriju serološko pretraživanje provodilo imunoenzimnim testom ID Screen Equine Viral Arteritis Indirect (ID.Vet, Grabels, Francuska), a samo odabranih 30 uzoraka, pozitivnih imunoenzimnim testom, dodatno su pretraženi u referentnom laboratoriju Animal Health Trust, Centre for Preventive Diagnostic, Newmarket, Ujedinjeno Kraljevstvo virus neutralizacijskim testom. Sve preostale godine obuhvaćene istraživanjem svi zaprimljeni uzorci za serološko pretraživanje na VAK pretraživani su isključivo VN-testom koje je provedeno u Laboratoriju za virusni arteritis konja Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zbog navedenoga rezultati zabilježeni pretraživanjem konja tijekom 2009. godine nisu uzimani u obzir za određivanje epizootioloških značajki virusnog arteritisa konja u RH s obzirom na neujednačenost dijagnostičkih postupaka u odnosu na preostale godine obuhvaćene istraživanjem.

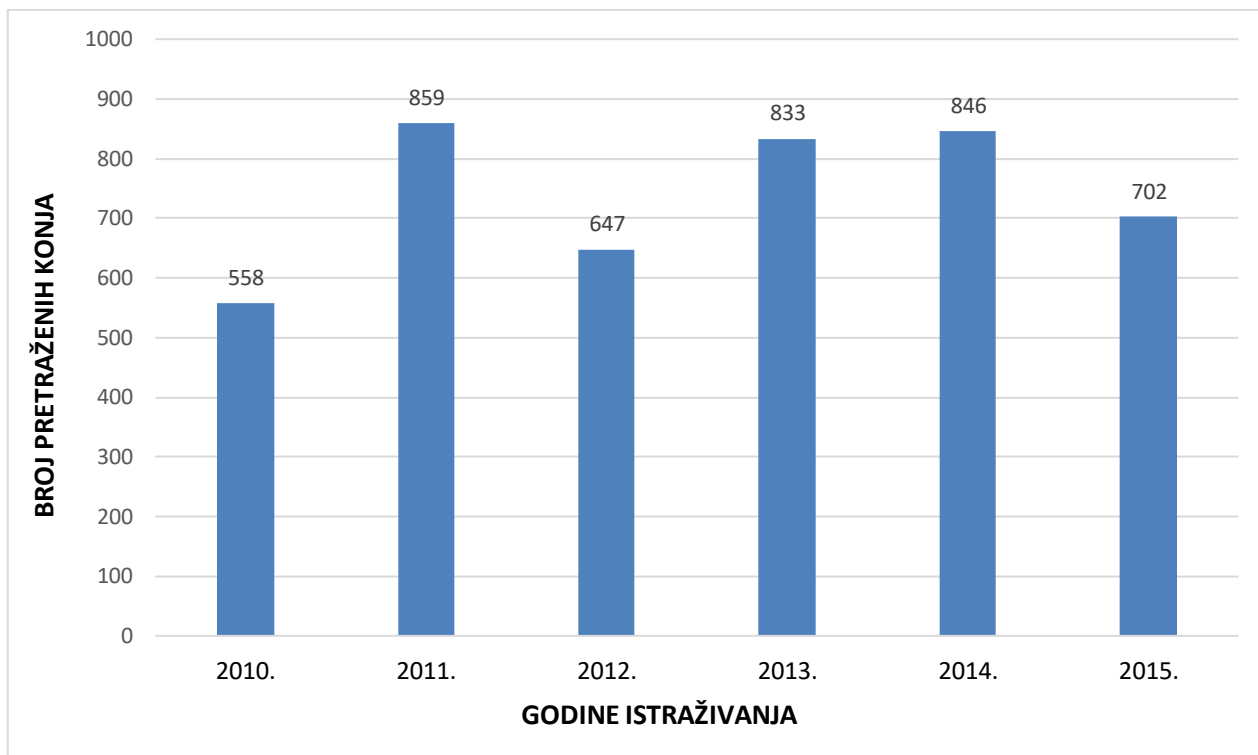
Tako je u preostalom razdoblju, od 2010. do 2015. godine, zaprimljeno za serološko pretraživanje na VAK sveukupno 4712 uzoraka seruma/pune krvi kopitara s područja RH.

Za svaki dostavljeni uzorak pregledan je popratni obrazac te su izdvojeni jasno naznačeni podaci o godini uzorkovanja, vrsti kopitara, dobi, spolu, kategoriji, pasmini životinje i županiji u kojoj kopitar boravi. Ovim podacima prikupljenim s popratnih obrazaca pridružen je rezultat pretraživanja VN-testom.

Nakon prikupljanja navedenih podataka iz prikaza i analize izostavljeni su podaci o pretraživanju magaraca u istraživanom razdoblju kao i jednog pastuha s područja Republike Srbije čiji uzorak je bio pretražen u Laboratoriju.

Stoga su za potrebe ovog istraživanja ukupno korišteni rezultati pretraživanja VN-testom i dostupni epizootiološki podaci za 4475 konja s područja RH, odnosno kada se oduzmu životinje pretražene VN-testom tijekom 2009. godine, sveukupno 4445 životinja.

Po godinama analizirani su podaci od 558 konja 2010. godine, što je bio najmanji broj pretraženih životinja na godišnjoj razini, do najviše 859 konja pretraženih 2011. godine (Slika 4.). Za sve navedene životinje bili su pouzdani podaci o godini uzorkovanja, županiji boravka konja i rezultatu pretraživanja VN-testom.

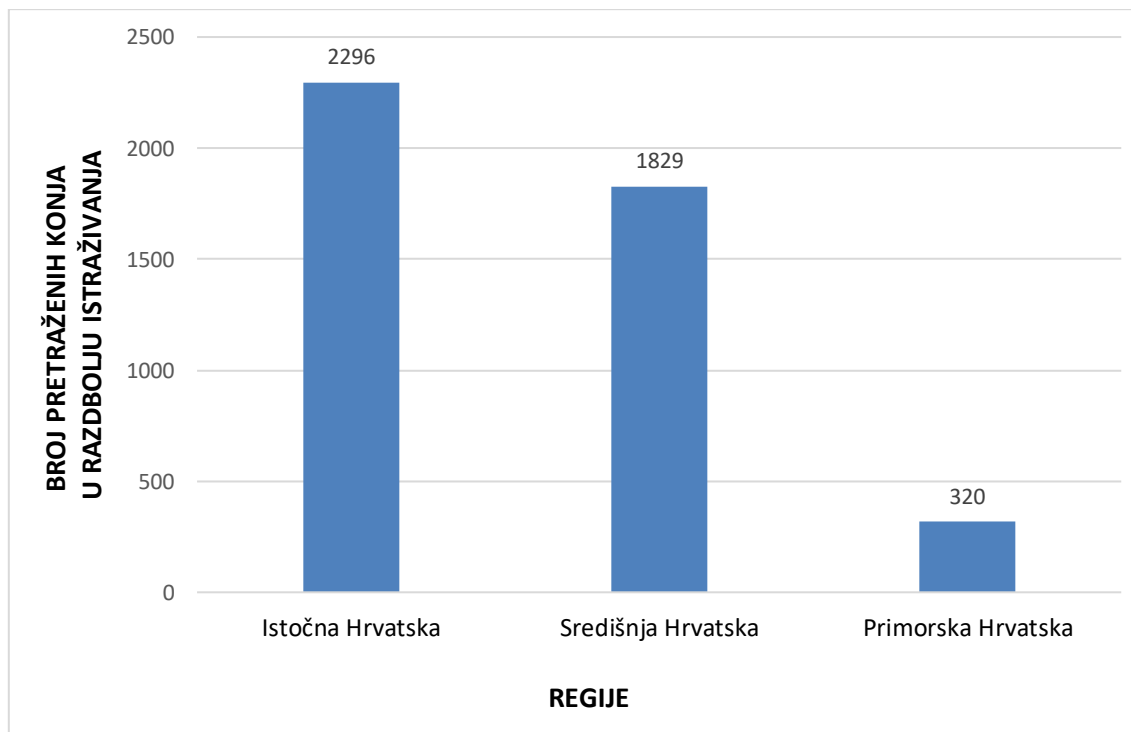


**Slika 4.** Grafički prikaz broja pretraženih konja po godinama

S obzirom na broj pretraženih konja po županijama, koji je u istraživanom razdoblju bio vrlo varijabilan, u svrhu određivanja značajnosti kretanja i razlika u seroprevalenciji županije su grupirane u tri prirodne regije RH. Tako su u regiju Istočna Hrvatska objedinjene Vukovarsko-srijemska, Osječko-baranjska, Brodsko-posavska, Požeško-slavonska i Virovitičko-podravska županija. Regija Središnja Hrvatska obuhvaća Koprivničko-križevačku, Varaždinsku, Međimursku, Krapinsko-zagorsku, Zagrebačku, Karlovačku i Sisačko-moslavačku županiju te Grad Zagreb. Preostale županije, Istarska, Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Šibenska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska svrstane su u regiju Primorska Hrvatska (Slika 5.) Broj uzoraka po ovako formiranim regijama kroz godine prikazan je grafički (Slika 6.).

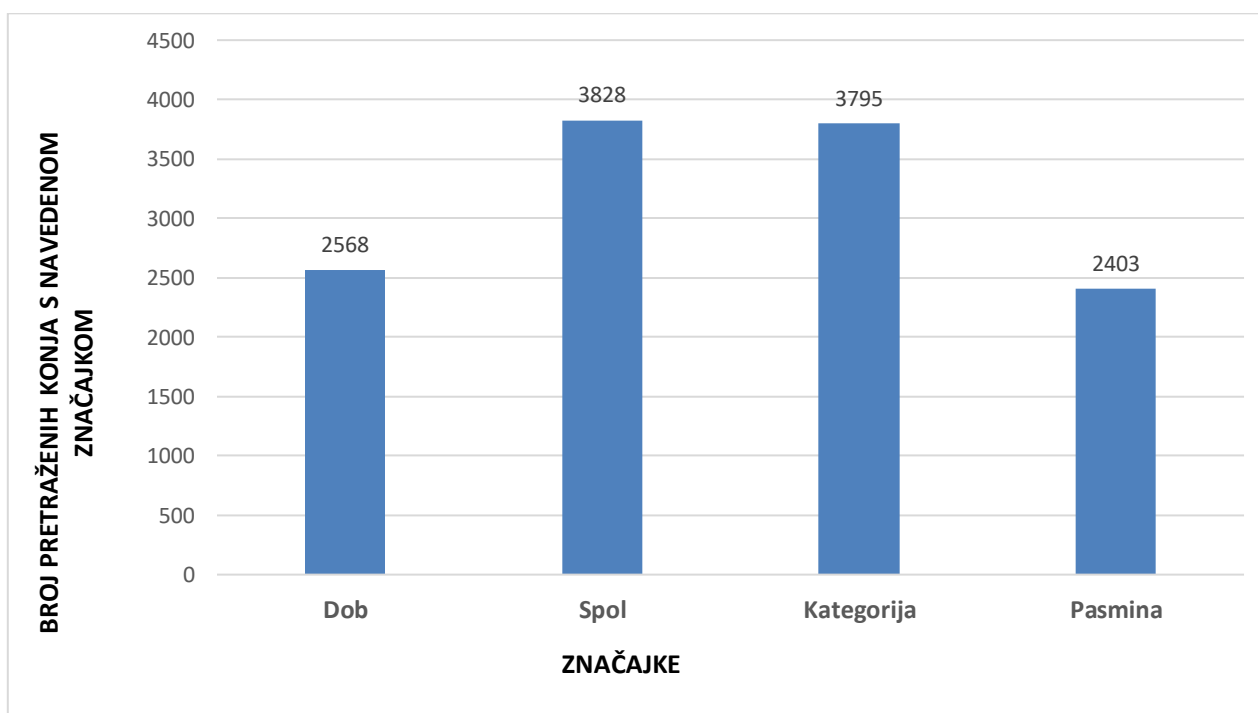


Slika 5. Republika Hrvatska podijeljena na tri regije za potrebe istraživanja



Slika 6. Broj pretraženih konja prema regijama Republike Hrvatske u razdoblju istraživanja (2010.-2015.)

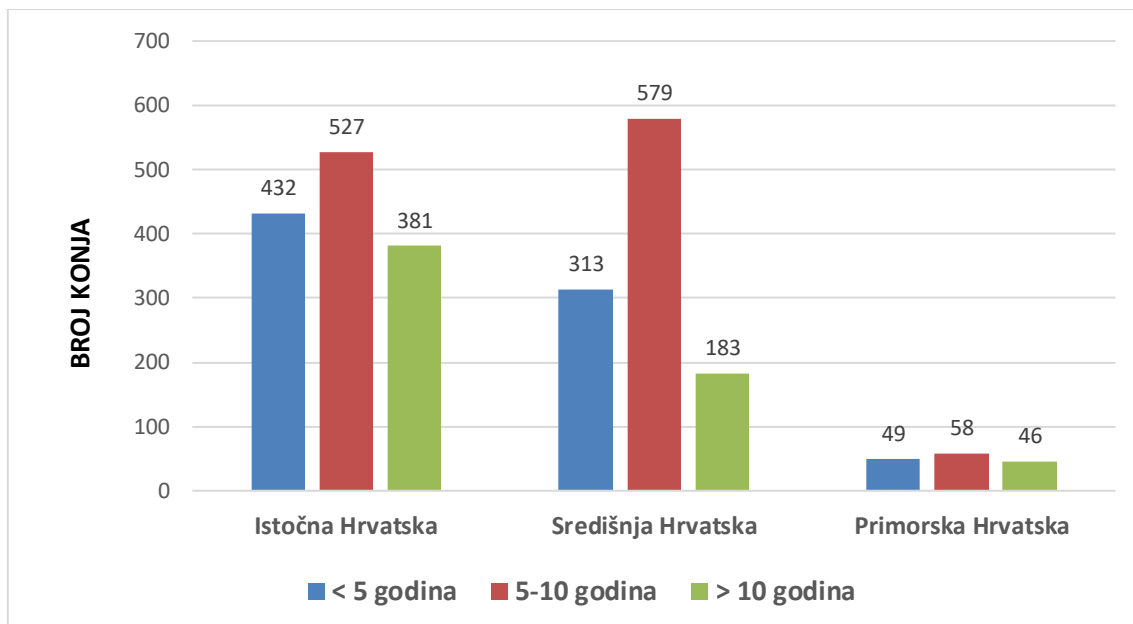
S obzirom na nepotpuno navođenje podataka o dobi, spolu, kategoriji i pasmini serološki pretraživanih konja u popratnim obrascima zaprimljenim uz uzorke, u analizi ovih značajki korišteni su isključivo podaci koji su bili jednoznačno istaknuti. Stoga je određivanje seroprevalencije i značajnosti utjecaja pojedinog epizootiološkog čimbenika načinjeno na različitom broju uzoraka ovisno o dostupnosti pouzdanih podataka na popratnim obrascima dostavljenim uz uzorke seruma/pune krvi konja za serološko pretraživanje na VAK VN-testom (Slika 7.).



**Slika 7.** Broj konja u istraživanom razdoblju (2010. – 2015.) za koje je na popratnom obrascu bila jednoznačno istaknuta pojedina analizirana značajka

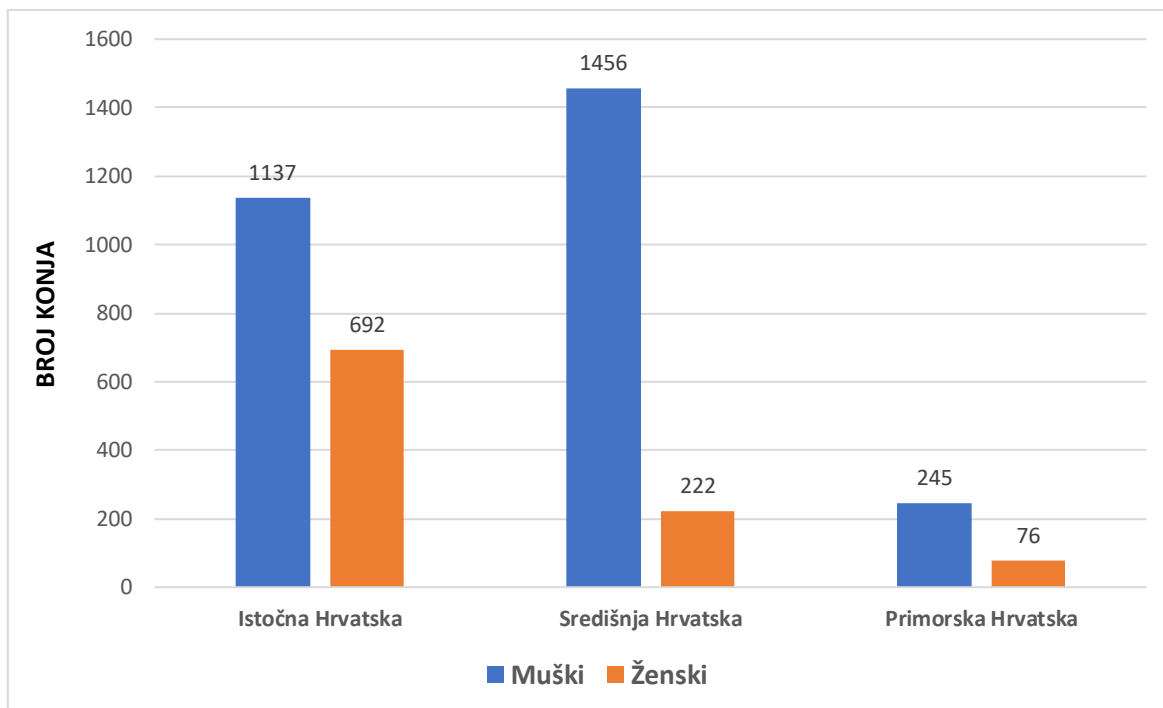


U svrhu određivanja epizootioloških značajki VAK na području RH pretraženi konji su prema dobi razvrstani u tri skupine: mlađi od pet godina, u dobi od pet do deset godina i stariji od 10 godina te su analizirani podaci o seroprevalenciji na razini regija (Slika 8.).



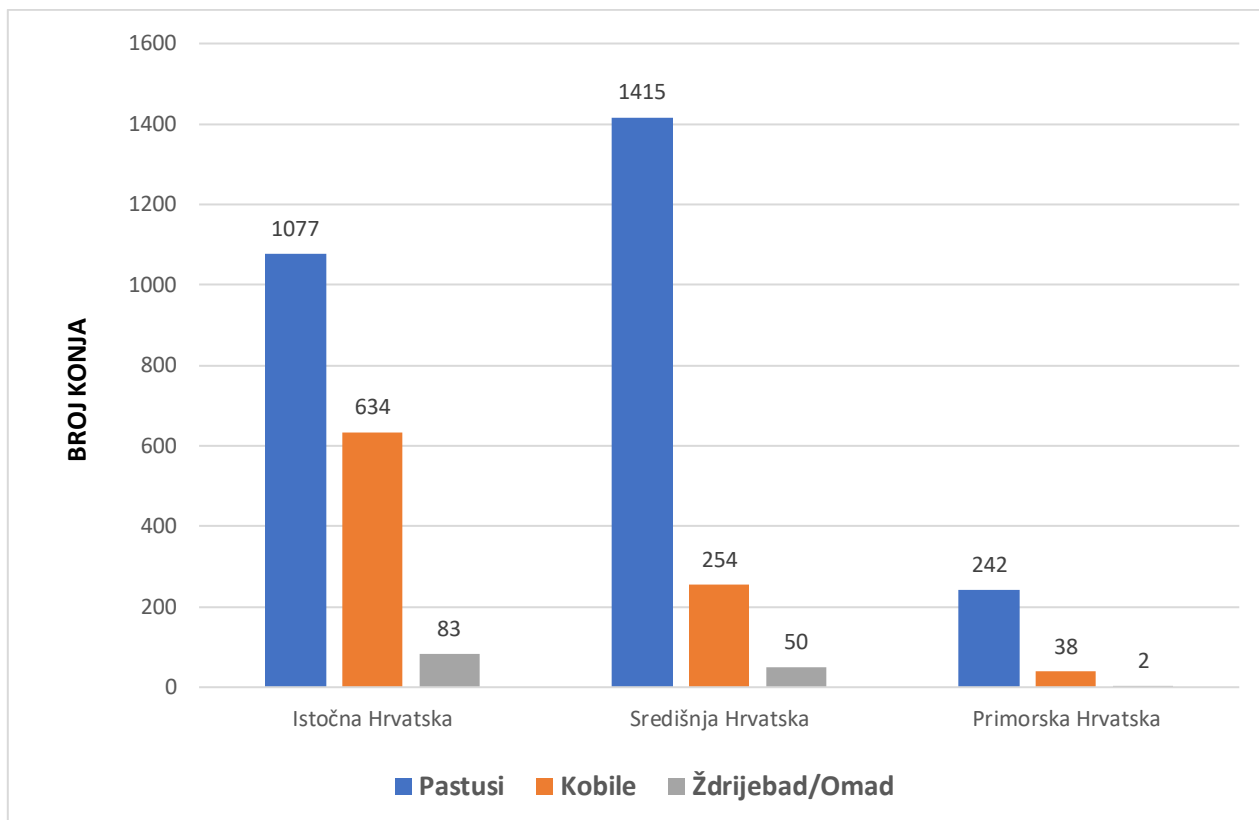
**Slika 8.** Grafički prikaz dobne strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH

Za potrebe određivanja seroprevalencije i analize razlika ovisno o spolu pretraživanih životinja na regionalnoj razini sve životinje za koje je jednoznačno istaknut spol podijelili smo na muške i ženske životinje (Slika 9.).



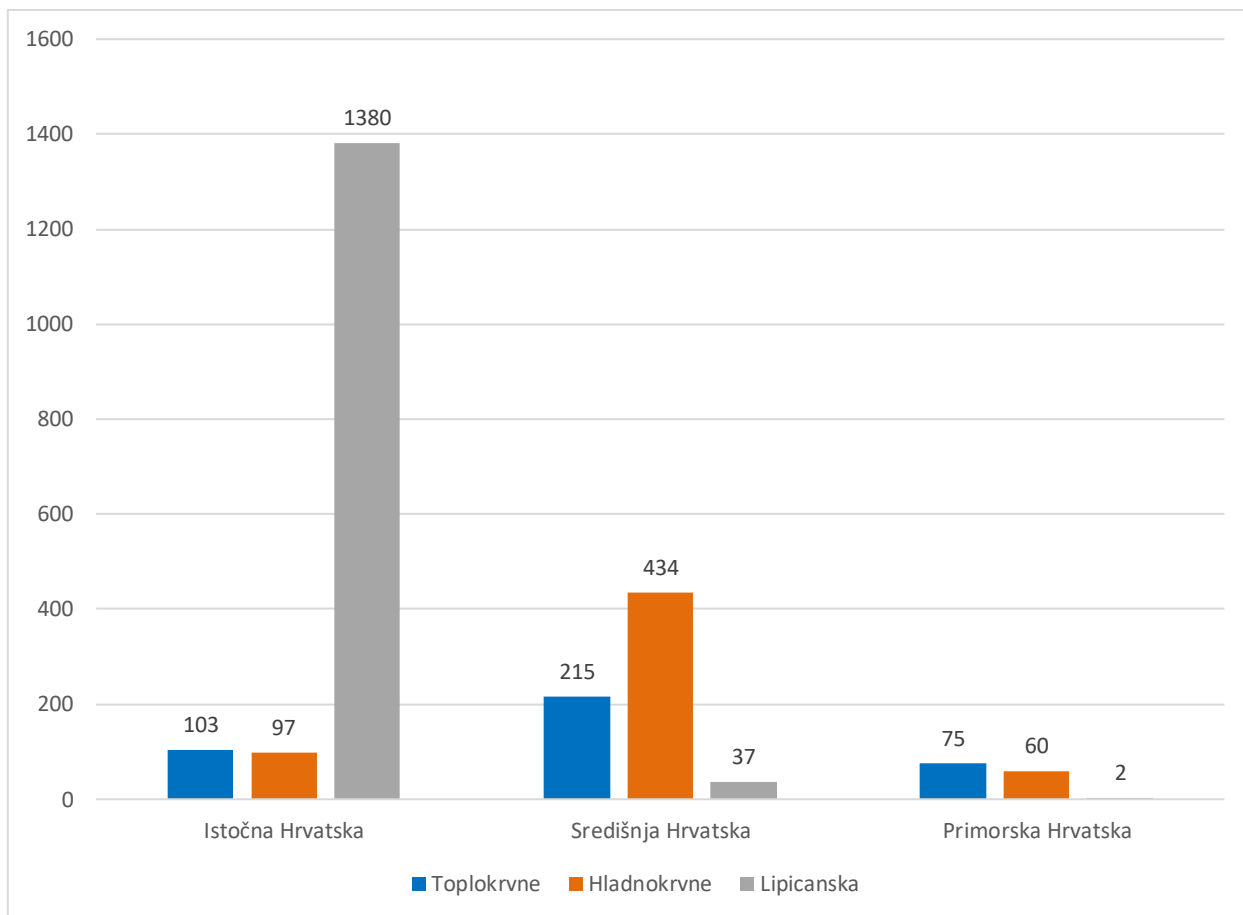
**Slika 9.** Grafički prikaz spolne strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH

Analizom prikupljenih podataka kategorije životinja za potrebe ovog istraživanja, su razvrstane u pastuhe, kobile i objedinjenu kategoriju ždrebadi i omadi. U navedenim kategorijama analizirana je seroprevalencija i utjecaj kategorije na razini RH i prema regijama u cjelokupnom razdoblju i prema godinama, a struktura uzorka prema kategorijama prikazana je na grafičkom prikazu (Slika 10.)



**Slika 10.** Grafički prikaz strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH po kategorijama pretraživanih životinja

Konje koje je iz pratećih obrazaca bilo moguće jednoznačno razvrstati u pasmine temeljem dostupnih podataka podijeljeni su u tri kategorije: toplokrvne pasmine, hladnokrvne pasmine i lipicanska pasmina koja je posebno izdvojena iz toplokrvnih pasmina zbog velikog broja uzoraka i epizootioloških značajki uzgoja lipicanaca na području RH. Struktura uzorka i broj pretraženih životinja pripadnika pojedine skupine na regionalnoj razini grafički je prikazana (Slika 11.) u nastavku.



**Slika 11.** Grafički prikaz strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH po pasminama pretraživanih životinja

#### **4.2. Statistička analiza epizootioloških značajki VAK na području RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine**

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programima R 4.0.5 (R Core Team, 2021.), Statistica v.14 (TIBCO Software Inc., 2020.) i MedCalc kalkulator omjera rizika koji je dostupan besplatno na mrežnoj stranici ([https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)). Statistička značajnost je određivana na razini  $p < 0,05$ .

Prikupljeni podaci za broj konja razvrstani po pojedinim čimbenicima rizika prikazani su u tablicama u obliku cijelih brojeva i postotaka. Prilikom izračunavanja utjecaja pojedinačnog čimbenika rizika korišten je test omjera izgleda (engl. *odds ratio* - OR), a rezultati su prikazani kao omjer izgleda (OR) uz 95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval* - CI). Ukoliko su prilikom izračuna u pojedinim poljima bile prisutne nule, vrijednost od 0,5 je dodana svim poljima (PAGANO i GAUVREAU, 2000.; DEEKS i HIGGINS, 2010.). P vrijednost je izračunata prema SHESKIN (2004.).

U analizi povezanosti seroprevalencije korišten je Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ), a rezultati su prikazani kao  $r$  i 95% interval pouzdanosti, a za analizu povezanosti između kvalitativnih nominalnih varijabli korišten je Cramerov V koeficijent ( $V$ ).

U izradi modela logističke regresije u model su uvršteni čimbenici rizika koji su se pojedinačno pokazali značajnima, a koji su ostali značajni i nakon uklanjanja iz analize svih životinja bez potpunih podataka. Također, prije uvrštavanja u model provjereno je da li je bila prisutna korelacija između pojedinih varijabli, te su određene varijable uklonjene na način da je zadržan model sa najvišim McFadden-ovim pseudo  $R^2$  (udio varijance zavisne varijable koji se može objasniti nezavisnim varijablama). Između

čimbenika rizika kategorija i dob utvrđena je korelacija  $V = 0,26$ , kategorija i spol  $V = 0,98$ . Pronađena korelacija proizlazi iz činjenice da je kategorija zapravo spoj spola i dobi.

Analiza relativne važnosti pojedinog čimbenika rizika u modelu (engl. *relative importance analysis*) je načinjena prema LUCHMAN (2014.).

### **4.3. Procjena opsega i kvalitete provođenja mjera nadzora VAK na području RH**

Kako bi dobili uvid u opseg provođenja mjera nadzora VAK na području RH u skladu s naređenim mjerama propisanom Naredbom za pojedinu godinu provođenja nadzora, usporedili smo broj očekivanih i načinjenih pretraživanja konja na području RH.

Broj očekivanih pretraga određen je temeljem dostupnih službenih podataka o brojnosti i kategorijama konja navedenom u Godišnjim izvješćima o konjogojstvu koja izdaje Hrvatska agencija za poljoprivredu Ministarstva poljoprivrede RH. Godišnja izvješća počela su biti javno dostupna tek 2013. godine (POLJAK i sur., 2014.) te su u disertacijom istraživanom razdoblju dostupna za još slijedeće dvije godine, 2014. (POLJAK i sur., 2015.) i 2015. godinu (POLJAK i sur., 2016.).

Iz navedenih izvješća prikupljeni su podaci o ukupnom broju pastuha i broju rasplodnih pastuha, kao i o broju kobila i rasplodnih kobila za svaku pojedinu godinu od 2013. do 2015. godine.

Broj očekivanih pretraga za pojedinu godinu određen je temeljem odredbe da se svi necijepljeni pastusi moraju pretražiti na VAK te je tom njihovom broju dodan broj potrebnih pretraga kobila koji je izračunat na osnovu broja kobila u pojedinoj godini te uobičajene razine koncepcije od 80% uz 4,5% očekivanih pobačaja. Što se tiče

očekivanog postotka koncepcije u idealnim uvjetima koji uključuju optimalne uvjete držanja, visoku razinu profesionalne brige za rasplodne konje i selekciju s obzirom na ranije korištenje u rasplodu, očekivani postotak koncepcije jako varira i iznosi 68%-95% (AMANN, 2006.) Uobičajeni postotak pobačaja u kobilama u fazi graviditeta koji bi vlasnici trebali uočiti i prijaviti pobačaj iznosi 4,5% (ROSE i sur., 2018.; WEBER i sur., 2018.). Broj načinjenih pretraga s kojim se uspoređivao ovaj broj određen je u ovom istraživanju. Dodatno je načinjena prosudba opsega provođenja mjera nadzora i suzbijanja VAK uvažavajući da su ciljna skupina samo službeno registrirani rasplodni pastusi i kobile za pojedinu godinu s dostupnim podacima o njihovom broju.

#### **4.4. Usporedba rezultata serološkog pretraživanja komercijalnim imunoenzimnim testovima i VN-testom**

##### **4.4.1. Arhivski uzorci seruma pretraživani VN-testom i komercijalnim imunoenzimnim testovima**

U svrhu određivanja mogućnosti korištenja komercijalnih imunoenzimskih testova u rutinskoj serološkoj dijagnostici VAK iz arhive Laboratorija za virusni arteritis konja odabrano je 50 seruma konja koji su ranije pretraženi VN-testom s pozitivnim rezultatom (titar protutijela  $\geq 1:4$ ).

Svi serumi ponovo su pretraženi VN-testom kako bi isključili odstupanje rezultata ranijeg pretraživanja koje je moglo nastati kao posljedica pohranjivanja i čuvanja uzoraka seruma pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz različito dugo vrijeme.

Uz navedene pozitivne serume za određivanje podudarnosti rezultata serološkog pretraživanja seruma konja na VAK iz arhive Laboratorija ARTER.lab odabrana su i 44

seruma konja koja su prethodnim serološkim pretraživanjem VN testom bila negativna (titar neutralizirajućih protutijela < 1:4). Prije pretraživanja komercijalnim imunoenzimnim testovima i ovi serumi su ponovo pretraženi VN-testom kako bi isključili bilo kakvu neusklađenost ranijih rezultata i vrijednosti neposredno prije pretraživanja komercijalnim imunoenzimnim testovima načinjenim za potrebe ovog istraživanja koje su mogle nastati uslijed pohranjivanja pri -80 °C u arhivu Laboratorija.

#### **4.4.2. Izvođenje serološke metode virus neutralizirajućeg testa (VN-test)**

Svi odabrani arhivski uzorci seruma konja (ukupno 94), s ranije pozitivnim ili negativnim rezultatom, pretraženi su VN-testom. VN-test je izvođen sukladno postupku opisanom od strane OIE-a uz manje modifikacije (OIE, 2018.).

##### **Pribor i oprema:**

- automatska pipeta 2-20 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- multikanalna automatska pipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- odgovarajući nastavci za pipetu
- jednokratne sterilne pipete 2, 5, 10 i 25 ml
- epruvete s čepom zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- epruvete s čepom zapremine 15 i 50 ml (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD)
- plastične bočice za rad sa staničnim kulturama površine 25, 75 i 150 cm<sup>2</sup>



- biozaštitna komora (Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija)
- invertni mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan)
- tresilica za mikrotitracijske plitice (Rotamax 120) (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- vrtložnik (ViBromix 104) (Domel d.o.o., Železniki, Slovenija)
- vodena kupelj (TS-100 Thermo Shaker, Biosan, Latvija)
- Bürker-Türkova komorica
- termostat 37 °C s CO<sub>2</sub> (Biolab 190) (Angelantoni industrie, Massa Martana, Italija)
- hladnjak 4 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzivač -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzivač -80 °C (Hera freeze HFU B) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

**Reagensi potrebni za uzgoj staničnih kultura i izvođenje VN-testa:**

- minimalni esencijalni medij (MEM) s Hanksovim solima (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- fetalni teleći serum (FTS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- kunićji serum (Rabbit Serum) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- otopina antibiotika za rad sa staničnim kulturama (penicilin 1000 i.j./ml, streptomycin 500 µg /ml, amfotericin B 2 µg /ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- solna otopina za ispiranje (balansirana otopina Hanksovih soli bez Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> i fenolnog crvenila) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

- 0,05% otopina tripsina EDTA pH 7,0 (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD)

#### **Virus i stanična kultura:**

- virus virusnog arteritisa konja virulentni soj Bucyrus (VBS) (ATCC VR-796)
- linijska stanična kultura bubrega kunića RK-13 (ATCC CCL-37)

#### **Umnažanje stanica linijske stanične kulture RK-13**

Za izvođenje VN-testa za serološku dijagnostiku VAK koristi se linijska stanična kultura RK-13. Umnažanje stanica RK-13 izvodi se bočicama za stanične kulture s čepom s rupicama i filtrom, a veličina korištene bočice ovisi o potrebnoj količini stanica i može biti površine 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> ili 150 cm<sup>2</sup>.

Stanice je potrebno pasirati svaki put kada u potpunosti prekriju površinu bočice za uzgoj stanica. To se obično radi u omjeru 1:2 na način da prvo MEM, otopinu tripsin-EDTA i solnu otopinu za ispiranje prije korištenja zagrijemo u vodenoj kupelji na temperaturu od 37 °C. Također da spriječimo kontaminaciju na svakih 100 ml odgovarajuće otopine dodamo 1 ml otopine antibiotika za stanične kulture.

Iz bočice s umnoženim stanicama odlije se u cijelosti hranjivi medij te se automatskom pipetom ili izravnim prelijevanjem dodaje solna otopina u količini dostatnoj da pokrije stanice u jednoličnom sloju od 5 mm nakon što se bočica polegne kako bi se ispirali ostatci hranjivog medija i poboljšala učinkovitost enzimske aktivnosti tripsina. Nakon što se uoči da sloj stanica izgleda kao jednolično bijelo zamućenje površine bočice, te uz kontrolu mikroskopiranjem invertnim mikroskopom, završi se ispiranje i pipetom ukloni solna otopina iz bočice.

Nakon završetka ispiranja solnom otopinom i njenog odstranjivanja u bočice se dodaje pipetom otopina tripsin-EDTA, a količina ovisi o površini bočice i može biti od 1 ml za bočice površine 25 cm<sup>2</sup> do 3 ml ukoliko se koristi boca površine 150 cm<sup>2</sup>.

Bočica s dodanim tripsinom se ostavlja kraće vrijeme u termostatu pri 37 °C, radi učinkovitijeg djelovanja enzima, te se povremeno protrese i pod invertnim mikroskopom prati kada će se stanice odvojiti od stjenke bočice čime je tripsinizacija završena.

Po završetku tripsinizacije u bočicu se doda nekoliko mililitara unaprijed pripremljenog hranjivog medija. Sadržaj se promiješa pipetom te se podijeli u više bočica ovisno o potrebama i količini stanica. U svaku novu bočicu nadopuni se određena količina medija (do ukupnog volumena 10 ml za bočice veličine 25 cm<sup>2</sup>, odnosno 25 ml za bočice veličine 75 cm<sup>2</sup> i 50 ml za bočice veličine 150 cm<sup>2</sup>) i stanice se nastavljaju uzgajati u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37° C dok ponovo ne prekriju cijelu površinu bočice kada se postupak tripsinizacije ponavlja. Na ovaj način stalno se održavaju raspoloživim stanice koje se koriste u izvođenju VN-testa.

### **Umnažanje virusa VAK na staničnoj kulturi RK-13**

Za umnažanje virusa VAK koji se koristi kao antigen u VN-testu inficiraju se stanice linijske stanične kulture RK-13. Stanična kultura se inficira u trenutku kada je stanicama prekriveno 70% - 80% bočice, a načini se tako da se istovremeno koriste dvije bočice stanične kulture RK-13. U jednu bočicu veličine 25 cm<sup>2</sup> se dodaje 1 ml MEM-a te nam ona služi kao kontrola, a u drugu 1 ml suspenzije virusa VAK. Bočice se inkubiraju tijekom jednog sata u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37 °C te se medij zamijeni s 9 ml hranjivog medija zagrijanog na 37 °C i 200 µl FTS. Nakon zamjene medija nastavlja se inkubacija

u termostatu te se bočice svakodnevno pregledavaju tijekom sljedećih četiri do sedam dana invertnim mikroskopom kako bi pratili pojavu citopatogenog učinka (CPU) virusa. U trenutku kada uočimo 60% ili više stanica s izraženim CPU-om inkubacija se završava te se bočica s virusom dvokratno zamrzava na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i odmrzava. Nakon toga se sadržaj bočice centrifugira pri 2200 okretaja/min tijekom 15 minuta i dobiveni supernatant odvaja u količini od 2 ml u kriotubice te zamrzava na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do titracije. Bočica s dodanim MEM-om je služila samo za kontrolu, a postupak umnažanja virusa je uspješan ako u njoj nema nikakvog CPU niti kontaminacije.

### **Priprema stanične kulture za korištenje u VN-testu**

Za korištenje u VN-testu stanice RK-13 moraju biti u koncentraciji od  $1.2 \times 10^5$  stanica u jednom mililitru.

Ova koncentracija se dobije na način da se stanice tripsinizirane na ranije opisani način u količini od 100  $\mu\text{l}$  dodaju u ependorff epruvetu zapremine 1.5 ml u koju je prethodno dodano 100  $\mu\text{l}$  0.4%-tne otopina tripanskog modrila. Nakon mješanja sadržaja ostavlja ga se tri do pet minuta pri sobnoj temperaturi te se nekoliko kapi dodaje na Bürker-Türkovu komoricu. Kako tripansko modrilo boji mrtve stanice, pod mikroskopom se prebroji samo neobojane (žive) stanice u četiri od devet kvadrata Bürker-Türkove komorice (u kutovima). Broj stanica u mililitru suspenzije preračunava se po formuli  $A=N:4*2*10^4$  u kojoj je A broj stanica u mililitru suspenzije, a N broj neobojenih (živih) stanica u sva četiri kvadrata. Dodavanjem određene količine hranjivog medija suspenziji stanica se razrijedi do potrebne koncentracije od  $1,2 \times 10^5$  stanica po mililitru koliko se koristi za izvođenje VN-testa.

### **Titracija virusa VAK za korištenje u VN-testu**

Virus VAK soj Bucyrus se u izvođenju VN-testa koristi u titru 100 TCID<sub>50</sub> (*engl.* 50% Tissue Culture Infectious Dose - virusna doza koja uzrokuje infekciju 50% inficiranih staničnih kultura). Kako bi virus umnožen na ranije opisani način dobili u potrebnom titru od 100 TCID<sub>50</sub> neophodno je prije korištenja u pretrazi načiniti titraciju virusa.

Titracija virusa se načini tako da se alikvotirani virus izvađen iz zamrzivača -80 °C temperira na sobnu temperaturu. Priredi se osam bočica zapremine 10 ml i označe se vodootpornim markerom sukladno kasnijim razrjeđenjima virusa od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-8</sup>. U tako označene bočice doda se po 450 µl VN-medija (MEM uz dodatak 5% kuničjeg seruma kao izvora komplementa). Nakon toga u prvu bočicu dodajemo 50 µl umnoženog virusa VAK te izmiješamo sadržaj bočice pipetom na način da najmanje 5 puta izvučemo i ponovno iz pipete vratimo sadržaj u bočicu. Nakon toga iz prve bočice, označene s 10<sup>-1</sup>, 50 µl mješavine prebacimo u drugu bočicu s oznakom 10<sup>-2</sup>. Ponovno izmiješamo na opisani način i 50 µl mješavine prebacimo u treću bočicu s oznakom 10<sup>-3</sup> te postupak miješanja i prebacivanja iste količine mješavine ponavljamo sve do posljednje osme bočice (oznaka 10<sup>-8</sup>). Na ovaj način priredili smo desetorostruka uzastopna razrjeđenja virusa koja se koriste u titraciji.

Titracija se izvodi na mikrotitracijskoj plitici s 96 jažica i ravnim dnom na način da je okrenemo vodoravno i označimo prema prikazanoj shemi (Slika 12.).

U sve jažice mikrotitracijske plitice dodajemo po 25 µl VN-medija, osim u jažice 1 i 12 svih redova mikrotitracijske plitice u koje dodajemo po 50 µl VN-medija. Nakon toga prethodno razrijeđen virus dodajemo u jažice mikrotitracijske plitice u količini od 25 µl

na način da razrijeđeni virus iz prve bočice (razrjeđenje  $10^{-1}$ ) dodajemo u jažice 2-11 reda H, virus iz druge bočice (razrjeđenje  $10^{-2}$ ) dodajemo u jažice 2-11 reda G, te dalje po istom principu do jažica 2-11 reda A u koje dodajemo istu količinu razrjeđenja virusa iz osme bočice (razrjeđenje virusa  $10^{-8}$ ). Ovako pripremljene plitice inkubiraju se tijekom jednog sat u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37 °C nakon čega se u sve jažice plitice dodaje po 50 µl suspenzije prethodno pripremljenih stanica RK-13 u koncentraciji od  $1,2 \times 10^5$  stanica po mililitru.

Plitice pripremljene na opisani način inkubiraju se u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37 °C do očitavanja rezultata koji se očitavaju nakon 72 sata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													$10^{-8}$
B													$10^{-7}$
C													$10^{-6}$
D													$10^{-5}$
E													$10^{-4}$
F													$10^{-3}$
G													$10^{-2}$
H													$10^{-1}$
	Kontrola stanica	Titracija virusa										Kontrola stanica	

Razrijeđenja virusa

**Slika 12.** Shematski prikaz plitice i jažica koje se koriste za kontrolu stanica i različita razrjeđenja virusa pri titraciji virusa VAK za korištenje u VN-testu

Pri očitavanju rezultata prvo se pregledava kontrola stanica u kojima mora biti potpuni sloj stanica RK-13 bez ikakve naznake CPU kako bi titracija bila valjana. Nakon toga

očitava se rezultat u jažicama u koje je dodan virus u različitim razrjeđenjima na način da se pozitivnima smatraju jažice s CPU-om izraženim na najmanje 50% sloja stanica.

Rezultat titracije virusa na osnovu kojeg se radi kasnije razrjeđenje virusa u radnu koncentraciju od 100 TCID<sub>50</sub> izračunava se iz očitanih rezultata prema Reed-Muench-ovoj formuli (REED i MUENCH, 1938.).

Nakon ovako određenog titra, odnosno određivanja broja TCID<sub>50</sub> u 25 µl umnoženog virusa korištenog u titraciji, izračuna se potrebno razrjeđenje kako bi u izvođenju VN-testa 25 µl načinjene radne suspenzije razrjeđenja virusa sadržavalo 100 TCID<sub>50</sub> virusa VAK.

### **Izvođenje VN-testa za serološku dijagnostiku VAK**

Za pretraživanje odabranih arhivskih uzoraka seruma konja prije izvođenja VN-testa nije provedena inaktivacija seruma u vodenoj kupelji tijekom 30 minuta pri 56°C s obzirom da je ista načinjena prije pretraživanja pri rutinskom dijagnostičkom pretraživanju te su inaktivirani serumi pohranjeni u arhivu Laboratorija.

VN-test se izvodio na mikrotitracijskim pliticama s 96 jažica i ravnim dnom. Ovisno o broju pretraživanih seruma odredio se broj potrebnih plitica na način da se na prvoj plitici načini kontrola stanica u 8 jažica, povratna titracija virusa u 24 jažice te pretraži dvostruko kontrolni pozitivni serum i kontrolni negativan serum. Na preostalom dijelu prve plitice pretražuju se još dva seruma konja također dvostruko. Na ostalim pliticama dvostruko se pretražuje šest seruma konja u razrjeđenjima od 1:2 do 1:256. Shema načina korištenja prve i preostalih plitica prikazana je na Slici 13. i Slici 14.

U svaku jažicu mikrotitracijskih plitica dodaje se po 25  $\mu$ l 5% VN-medija osim na plitici 1 u jažice A1 do A4 i B1 do B4 u kojima radimo kontrolu stanica pri izvođenju svakog VN-test. U navedene jažice stavljamo po 50  $\mu$ l 5% VN-medija. Nakon toga na plitici 1 u jažice H5 i H6 stavljamo po 25  $\mu$ l kontrolnog pozitivnog seruma te u jažice H7 i H8 po 25  $\mu$ l kontrolnog negativnog seruma čime u navedenim jažicama imamo razrjeđenje kontrolnih seruma 1:2. Sadržaj jažica H5 do H8 promiješamo pipetom te prebacujemo po 25  $\mu$ l izmiješanog sadržaja iz jažica H5 do H8 u jažice G5 do G8 gdje ponovo promiješamo sadržaj, te 25  $\mu$ l prebacimo u jažice F5 do F8. Ovaj postupak prebacivanja i miješanja ponavljamo do jažica A5 do A8 iz kojih nakon miješanja odbacujemo 25  $\mu$ l sadržaja. Na ovaj način načinili smo dvostruka razrjeđenja kontrolnih seruma na plitici 1 od 1:2 do 1:256.

Razrjeđenja svih pretraživanih seruma načinimo također u dva stupca jažica mikrotitracijske plitice na način da prvo na plitici 1 u jažice H9 i H10 dodamo po 25  $\mu$ l prvog ispitujućeg seruma, zatim u jažice H11 i H12 drugog ispitujućeg seruma. Kako je u navedene jažice prethodno dodano 25  $\mu$ l VN-medija u njima imamo početno razrjeđenje pretraživanih seruma 1:2. Ostale ispitujuće serume dodajemo u istoj količini od 25  $\mu$ l u po dvije jažice reda H prema rasporedu prikazanom na Slici 14. za sve preostale korištene plitice čiji broj ovisi o broju seruma koji se pretražuju u izvedbi VN-testa. Dvostruka uzastopna razrjeđenja pretraživanih seruma načinimo na način opisan za kontrolne serume miješanjem i prebacivanjem po 25  $\mu$ l sadržaja jažica od H9 do H12 plitice 1, odnosno cijelog reda H preostalih plitica, do jažica A9 do A12 plitice 1, odnosno cijelog reda A ostalih plitica. Ovim postupkom načinili smo dvostruka uzastopna razrjeđenja



pretraživanih seruma od 1:2 do 1:256 za svaki pretraživani serum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kontrolna stanica	A												1:256
	B												1:128
Kontrolna titracija standardne virusne doze	C												1:64
	D												1:32
	E												1:16
	F												1:8
	G												1:4
	H												1:2
	100 TCID <sub>50</sub>	10 TCID <sub>50</sub>	1 TCID <sub>50</sub>	0.1 TCID <sub>50</sub>	Kontrolni pozitivni serum		Kontrolni negativni serum		Pretraživani serum I-1		Pretraživani serum I-2		

**Slika 13.** Shema prve plitice u postupku izvođenja VN-testa na kojoj se izvodi kontrola stanica, povratna titracija virusa, pretraživanje kontrolnih seruma i pretraživanje dva uzorka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													1:256
B													1:128
C													1:64
D													1:32
E													1:16
F													1:8
G													1:4
H													1:2
	Pretraživani serum I-3		Pretraživani serum I-4		Pretraživani serum I-5		Pretraživani serum I-6		Pretraživani serum I-7		Pretraživani serum I-8		

**Slika 14.** Shema ostalih plitica na kojima se dvostruko pretražuje svaki uzorak seruma

Za povratnu titraciju virusa na plitici 1 načinimo desetorostruka uzastopna razrjeđenja radne koncentracije virusa prethodno istitirane i razrijeđenu na titar 100 TCID<sub>50</sub> u 25 µl na ranije opisani način. Ovo načinimo tako da pripremimo četiri bočice zapremine 10 ml. U prvu dodamo 450 µl virusa u titru od 100 TCID<sub>50</sub> u 25 µl, a u ostale tri po 450 µl MEM-a uz dodatak 5% kunićjeg seruma. Iz prve bočice 50 µl virusa u radnom titru prebacimo u drugu bočicu te pipetiranjem promiješamo. Zatim iz druge bočice 50 µl mješavine prebacimo u treću bočicu te nakon miješanja 50 µl prebacujemo u četvrtu bočicu u kojoj također promiješamo sadržaj pipetiranjem. Na ovaj način dobijemo desetorostruka uzastopna razrjeđenja radne koncentracije virusa. U daljnjem postupku iz prve bočice u kojoj je virus titru 100 TCID<sub>50</sub> dodajemo po 25 µl sadržaja u jažice plitice 1 od H1 do C1. Iz druge bočice u kojoj je virus razrijeđen na 10 TCID<sub>50</sub> dodajemo po 25 µl sadržaja u jažice H2 do C2 plitice 1. Iz treće bočice u kojoj je SVD razrijeđena na 1 TCID<sub>50</sub> dodajemo po 25 µl sadržaja u jažice H3 do C3, te konačno iz četvrte bočice u kojoj je virus razrijeđen na 0,1 TCID<sub>50</sub> dodajemo po 25 µl sadržaja u jažice H4 do C4 plitice 1.

Po završetku ovako načinjenog dvostrukog razrjeđivanja kontrolnih i pretraživanih seruma te povratne titracije virusa dodajemo po 25 µl standardne virusne doze u sve jažice svih plitica osim u jažice od 1 do 4 svih 8 redova plitice 1 u kojima radimo kontrolu stanica i povratnu titraciju virusa. Plitice pripremljene na opisani način se inkubiraju tijekom jednog sata u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37°C nakon čega se u sve jažice svih plitica dodaje po 50 µl suspenzije prethodno pripremljenih stanica RK-13 u koncentraciji od 1,2 x 10<sup>5</sup> stanica po mililitru.

Po završetku opisanog postupka plitice se inkubiraju u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37°C slijedeća 72 sata do očitavanja rezultata. Nakon 72 sata očitava se rezultat, a preduvjet za vjerodostojne rezultate je potpuni sloj stanica bez CPU u jažicama u kojima se kontrolira

stanična kultura te izražen CPU u jažicama u kojima je dodan virus u titru 100 TCID<sub>50</sub> i 10 TCID<sub>50</sub> kao i izostanak CPU-a u jažicama u kojima je virus dodan u titru 0,1 TCID<sub>50</sub>. Uz navedeno preduvjet za vjerodostojne rezultate je i CPU u svim jažicama u kojima se pretraživao negativan serum kao i potvrđen titar protutijela koji ne odstupa za više od jednog razrjeđenja od ranije određenoga za kontrolni pozitivni serum.

Rezultati pretrage za svaki pretraživani serum očitavaju se kao najviše razrjeđenje seruma u kojemu izostaje CPU ili je on manji od 50%. Kako se svaki serum pretražuje dvostruko, konačni titar pretraživanog seruma je geometrijska sredina rezultata dva pretraživanja.

#### **4.4.3. Pretraživanje arhivskih seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testovima**

Na tržištu su u ovom trenutku dostupna dva komercijalna imunoenzimna testa za serološku dijagnostiku VAK. Tržišno dostupni testovi su ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (ID.Vet, Grabels, Francuska) i INgezim Arteritis 2.0 (Eurofins Technologies Ingenasa, Madrid, Španjolska) te su arhivski uzorci seruma pretraženi njima, a rezultati pretraživanja uspoređeni s VN-testom kako bi prosudili mogućnost njihova korištenja u rutinskoj dijagnostici.

Komercijalni ELISA test ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (ID.Vet, Grabels, Francuska) je indirektna ELISA metoda kojom se dokazuju protutijela za VAK u serumu ili plazmi konja. INgezim Arteritis 2.0 (Eurofins Technologies Ingenasa, Madrid, Španjolska) je također indirektna ELISA koja se osniva na korištenju monoklonskih protutijela za IgG protutijela konja.

Korištenjem ova dva komercijalna kompleta pretražena su ukupno 94 arhivska uzorka seruma konja od kojih je prethodnim pretraživanjem 50 bilo pozitivno VN-testom, a 44 negativno (opisano u ranijem potpoglavlju).

### **Pribor i oprema**

- automatska pipeta zapremine 2 – 20 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta zapremine 10 – 100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta zapremine 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- višekanalna pipeta zapremine 30 – 300 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- odgovarajući nastavci za pipete
- plastične kadice za pipetiranje
- jednokratne plastične pipete zapremine 5 ml i 10 ml
- vrtložnik (RS-VA10) (Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Njemačka)
- termostat 37 °C s CO<sub>2</sub> (Biolab 190) (Angelantoni industrie, Massa Martana, Italija)
- staklena menzura zapremine 100 ml
- erlenmayerova tikvica zapremine 300 ml
- erlenmayerova tikvica zapremine 100 ml
- stalak za Eppendorf epruvete
- lateks rukavice
- staničevina
- zaporni sat
- ispirać mikrotitracijskih plitica HydroFLEX (TECAN, Männedorf, Švicarska)
- čitač mikrotitracijskih plitica Sunrise (TECAN, Männedorf, Švicarska).

- mikrotitracijske plitice s 96 jažica i ravnim dnom s prethodno vezanim antigenom u jažicama parnih stupaca (ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect)
- mikrotitracijske plitice s 96 jažica i ravnim dnom s prethodno vezanim antigenom u svim jažicama (INgezim Arteritis 2.0)
- mikrotitracijske plitice s 96 jažica i ravnim dnom bez prethodno vezanog antigena u jažicama (INgezim Arteritis 2.0)

### **Reagensi**

- dvostruko destilirana sterilna voda (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD)
- sadržaj **ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect** komercijalnog kompleta:

Pozitivni kontrolni serum 1 ml

Negativan kontrolni serum 1 ml

Puferska otopina 2 - za razrijeđivanje seruma 60 ml

Otopina konjugata 10x koncentrirana 6 ml

Puferska otopina 3 - za razrijeđivanje konjugata 60 ml

Otopina za ispiranje 20x koncentrirana 60 ml

Otopina supstrata 60 ml

Otopina za zaustavljanje reakcije (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M) 60 ml

- sadržaj **INgezim Arteritis 2.0** komercijalnog kompleta:

Pozitivni kontrolni serum 4 ml

Negativni kontrolni serum 4 ml

Otopina konjugata (monoklonska protutijela s peroksidazom hrena) 50 ml

Otopina za ispiranje 25x koncentrirana 125 ml

Otopina za razrjeđivanje seruma (DE13-01) 125 ml

Otopina supstrata (TMB) 65 ml

Otopina za zaustavljanje reakcije (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 65 ml

#### **4.4.4. Postupak serološkog pretraživanja seruma konja na VAK korištenjem komercijalne ELISA-e ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect**

Komercijalni ELISA test ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect je indirektna ELISA koja se osniva na dodavanju, u proizvodnji, antigena u parne stupce plitice (2., 4., 6., 8., 10. i 12.) te ne dodavanju u neparne. Na ovaj način pretraživanjem svakog seruma u pojednoj jažici parnog i neparnog stupca dolazi do vezanja protutijela iz pretraživanog seruma u parnim stupcima i izostanka vezanja u neparnim. Razlike u očitanim rezultatima su dokaz prisustva protutijela za VAK, a ovakva provedba isključuje druge nespecifične utjecaje na rezultat pretraživanja. Pretraga se izvodi na način opisan u nastavku.

Cijeli sadržaj komercijalnog ELISA kompleta izvadi se iz hladnjaka, u kojem se pohranjuje do uporabe pri 4 °C, i temperira na sobnu temperaturu. Sve reagense se protrese na vrtložniku radi homogenizacije. Nakon toga uzima se mikrotitracijska plitica s prethodno vezanim antigenom u jažicama parnih stupaca, koja je dio sadržaja kompleta, i u svaku jažicu se dodaje po 90 µl puferske otopine 2 koja služi za razrjeđivanje seruma. Nakon toga kontrolni pozitivan i negativan serum te pretraživani serumi u količini od 10 µl dodaju se u jažice mikrotitracijske plitice. Kako bi izbjegli vremenski odmak u

dodavanju prvog i posljednjeg seuma na mikrotitracijskoj plitici moguće je serume prvo dodati na sterilnu mikrotitracijsku pliticu nakon čega se prenose multikanalnom pipetom na mikrotitracijsku pliticu iz kompleta.

Pozitivni kontrolni serum dodaje se u jažice A1 i A2 te B1 i B2. Negativni kontrolni serum se dodaje u jažice C1 i C2 te D1 i D2. Svaki slijedeći pretraživani serum dodaje se u po dvije jažice, jednu u neparnom, a drugu u susjednom parnom stupcu. Tako se prvi pretraživani serum dodaje u jažice E1 i E2, slijedeći u F1 i F2 i tako do kraja mikrotitracijske plitice. Na ovaj način na svakoj mikrotitracijskoj plitici može se pretražiti po 44 seruma (Slika 15.).

Mikrotitracijska plitica s dodanim kontrolnim i pretraživanim serumima na opisani način inkubira se 45 ( $\pm$  3) minuta pri 37 °C nakon čega slijedi pražnjenje jažica uz istresanje zaostalog sadržaja na staničevinu.

Ispražnjena mikrotitracijska plitica ispiri se tri puta s 300  $\mu$ l otopine za ispiranje koja je prethodno priređena razrjeđivanjem otopine za ispiranje 20x koncentrirane s destiliranom vodom. Ispiranje je načinjeno pomoću automatskog ispiraća mikrotitracijskih plitica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	PK	P-5	P-5	P-13	P-13	P-21	P-21	P-29	P-29	P-37	P-37
B	PK	PK	P-6	P-6	P-14	P-14	P-22	P-22	P-30	P-30	P-38	P-38
C	NK	NK	P-7	P-7	P-15	P-15	P-23	P-23	P-31	P-31	P-39	P-39
D	NK	NK	P-8	P-8	P-16	P-16	P-24	P-24	P-32	P-32	P-40	P-40
E	P-1	P-1	P-9	P-9	P-17	P-17	P-25	P-25	P-33	P-33	P-41	P-41
F	P-2	P-2	P-10	P-10	P-18	P-18	P-26	P-26	P-34	P-34	P-42	P-42
G	P-3	P-3	P-11	P-11	P-19	P-19	P-27	P-27	P-35	P-35	P-43	P-43
H	P-4	P-4	P-12	P-12	P-20	P-20	P-28	P-28	P-36	P-36	P-44	P-44

**Slika 15.** Shematski prikaz dodavanja pozitivnog i negativnog seruma te pretraživanih seruma na mikrotitracijsku pliticu sadržanu u kompletu ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (PK – pozitivni kontrolni serum, NK – negativni kontrolni serum, P- pretraživani serumi)

Za slijedeći korak potrebno je prirediti radnu otopinu konjugata. Kako konjugat dolazi u komercijalnom kompletu kao 10x koncentrirana otopina, radna otopina se priprema njegovim razrjeđivanjem puferском otopinom 5. Ovako pripremljenu radnu otopinu konjugata dodajemo u svaku jažicu mikrotitracijske plitice u količini od 100 µl. Nakon dodavanja radne otopine konjugata plitica se inkubira pri sobnoj temperaturi 21 °C ( $\pm$  5°C ) tijekom 30 ( $\pm$  3) minuta.

Nakon inkubacije ponavlja se postupak ispiranja pomoću automatskog ispirača mikrotitracijskih plitica tri puta s 300 µl otopine za ispiranje uz prethodno odstranjivanje sadržaja jažica i isušivanje istresanjem na staničevinu. Poslije ovakvog ispiranja i isušivanja u svaku jažicu mikrotitracijske plitice dodaje se multikanalnom pipetom po 100 µl otopine supstrata te se zaštićeno od svjetla inkubira pri sobnoj temperaturi 21 °C ( $\pm$  5°C ) tijekom 15 ( $\pm$  1) minuta. Po proteku vremena inkubacije u svaku jažicu se multikanalnom pipetom dodaje po 100 µl otopine za zaustavljanje reakcije koja je također u sadržaju komercijalnog kompleta.

Reakcija će se očitovati kolorimetrijski te je proporcionalna prisustvu ili odsustvu protutijela za VAK u pretraživanim serumima. Rezultat se očitava neposredno nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije pomoću čitača mikrotitracijskih plitica pri valnoj duljini od 450 nm.



Pouzdanost rezultata provjerava se očitanom vrijednošću za pozitivan i negativan kontrolni serum. Rezultat pozitivnog kontrolnog seruma određuje se na način da se od očitanih vrijednosti u jažicama u parnim stupcima oduzme vrijednost očitana u neparnom stupcu (A2-A1 i B2-B1). Takav rezultat mora biti  $> 0,350$  ukoliko je pretraga dobro načinjena. Na isti način se određuje rezultat pretraživanja negativnog kontrolnog seruma (C2-C1 i D2-D1).

Dodatni kriterij potvrde dobro izvedenog testa je da je omjer srednjih vrijednosti rezultata dobivenih pretraživanjem pozitivnih seruma u odnosu na srednju vrijednost rezultata pretraživanja negativnih seruma veći od 3.

Kada su zadovoljeni prethodno navedeni kriteriji možemo smatrati da je pretraga dobro načinjena te izračunavamo rezultate za svaki pretraživani serum na način da očitane vrijednosti pretraživanja svakog seruma u parnoj jažici umanjimo za onu u neparnoj jažici. Ovakva vrijednost se podijeli s rezultatom za pozitivni kontrolni serum te množi sa 100 prema slijedećoj formuli:

$$\text{Rezultat pretrage za pretraživani serum (\%)} = \frac{\text{Očitana vrijednost za serumu u parnoj jažici} - \text{Očitana vrijednost za serumu u neparnoj jažici}}{\text{Rezultat za pozitivni kontrolni serum}} \times 100$$

Prosudba rezultata za svaki pretraživani serum radi se tako da se pozitivnim smatra svaki onaj čiji je rezultat pretraživanja izračunat na navedeni način  $> 60\%$ , negativnim ako je rezultat  $\leq 50\%$ , a sumnjiv ukoliko je rezultat pretraživanja seruma između  $50\%$  i  $60\%$ .

#### **4.4.5. Postupak serološkog pretraživanja seruma konja na VAK korištenjem komercijalne ELISA-e Ingezim Arteritis 2.0**

Indirektna ELISA Ingezim Arteritis 2.0 načinjena je tako da u kompletu dolaze dvije mikrotitracijske plitice od kojih je na jednoj vezan antigen VAK, a na drugoj nije. Ukoliko je pretraživani serum pozitivan protutijela se vežu u jažice ploče s u proizvodnji vezanim antigenom, a ne vežu se u drugoj mikrotitracijskoj plitici bez antigena. Razlika između rezultata na kraju izvedbe metode očitanih za isti serum u mikrotitracijskoj plitici s antigenom i onoj bez je dokaz prisustva protutijela za VAK, a korištenjem ove dvije plitice isključuju se drugi nespecifični utjecaji na rezultat.

Sama metoda se izvodi korištenjem reagensa sadržanih u komercijalnom kompletu na način da se cijeli sadržaj kompleta, s izuzetkom otopine konjugata, izvadi iz hladnjaka u kojem se čuva do uporabe i temperira na sobnu temperaturu (20-25°C).

Svi serumi se prije pretraživanja moraju razrijediti u omjeru 1:100 (5 µl pretraživanog seruma s 495 µl otopine za razrijeđivanje seruma) osim kontrolnog pozitivnog i negativnog seruma iz komercijalnog kompleta koji dolazi u radnoj koncentraciji.

Nakon toga se kontrolni serumi i prethodno razrijeđeni pretraživani serumi dodaju istovremeno na iste pozicije na mikrotitracijsku pliticu sa i mikrotitracijsku pliticu bez vezanog antigena. Tako se kontrolni negativni serum dodaje u jažice A1 i B1 na obje plitice, a kontrolni pozitivan na pozicije C1 i D1. Ovakvo dvostruko pretraživanje kontrolnih seruma provodi se radi pouzdanosti rezultata pretrage.

U nastavku se svaki ispitujući prethodno razrijeđeni serum dodaje redom u iste jažice na obje plitice (E1, F1, G1...) do posljednjeg u jažice H12 obje plitice. Opisanim načinom na dvije plitice (sa i bez antigena) ukupno možemo pretražiti 92 seruma konja (Slika 16.).

Nakon dodavanja seruma prema opisanom redoslijedu, mikrotitracijske plitice se zalijepe samoljepljivom folijom, koja dolazi unutar kompleta, i inkubiraju tijekom dva sata u termostatu pri 37 °C. Po isteku inkubacije prazni se sadržaj plitica i ispiru se tri puta s po 300 µl otopine za ispiranje, koja je ranije načinjena razrjeđivanjem koncentrirane otopine za ispiranje iz kompleta s destiliranom vodom u omjer 1:25, u automatskom ispiraču mikrotitracijskih plitica. Plitice se dodatno posuše nakon ispiranja istresanjem na staničevinu te se dodaje po 100 µl otopine konjugata u svaku jažicu obje plitice. Plitice se ponovo zalijepe samoljepljivom folijom i inkubiraju tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

Po isteku vremena inkubacije odstranjuje se sadržaj iz plitica te se ispiru na ranije opisan način šest puta uz isušivanje istresanjem na staničevinu nakon ispiranja.

Mikrotitracijska pločica s dodanim antigenom												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	A5	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	A69	A77	A85
B	C-	A6	A14	A22	A30	A38	A46	A54	A62	A70	A78	A86
C	C+	A7	A15	A23	A31	A39	A47	A55	A63	A71	A79	A87
D	C+	A8	A16	A24	A32	A40	A48	A56	A64	A72	A80	A88
E	A1	A9	A17	A25	A33	A41	A49	A57	A65	A73	A81	A89
F	A2	A10	A18	A26	A34	A42	A50	A58	A66	A74	A82	A90
G	A3	A11	A19	A27	A35	A43	A51	A59	A67	A75	A83	A91
H	A4	A12	A20	A28	A36	A44	A52	A60	A68	A76	A84	A92

Mikrotitracijska pločica bez dodanog antigena												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	A5	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	A69	A77	A85
B	C-	A6	A14	A22	A30	A38	A46	A54	A62	A70	A78	A86
C	C+	A7	A15	A23	A31	A39	A47	A55	A63	A71	A79	A87
D	C+	A8	A16	A24	A32	A40	A48	A56	A64	A72	A80	A88
E	A1	A9	A17	A25	A33	A41	A49	A57	A65	A73	A81	A89
F	A2	A10	A18	A26	A34	A42	A50	A58	A66	A74	A82	A90
G	A3	A11	A19	A27	A35	A43	A51	A59	A67	A75	A83	A91
H	A4	A12	A20	A28	A36	A44	A52	A60	A68	A76	A84	A92

**Slika 16.** Shematski prikaz dodavanja pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma te pretraživanih seruma na mikrotitracijske pločice sa i bez vezanog antigena sadržane u kompletu Ingezim Arteritis 2.0

(C- -negativni kontrolni serum, C+ - pozitivni kontrolni serum, A – pretraživani serum)

Nakon opisanog ispiranja dodaje se u svaku jažicu obje pločice po 100 µl supstrata te se mikrotitracijske pločice inkubiraju sljedećih 10 minuta. Po isteku vremena inkubacije dodaje se otopina za zaustavljanje reakcije u sve jažice obje pločice u količini od 100 µl te se pomoću čitača mikrotitracijskih pločica pri valnoj duljini od 450 nm očitava optička gustoća u svakoj jažici obje pločice u roku od 5 minuta od dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

Rezultat očitavanja za svaki pretraživani, kao i pozitivan i negativan kontrolni serum, se izračunava na način da se od optičke gustoće očitane u jažici na plitici s dodanim antigenom oduzme optička gustoća očitana u jažici s istim serumom na plitici bez dodanog antigena.

Pouzdanost dobivenih rezultata provjerava se temeljem kriterija da je razlika optičke gustoće za pozitivan serum u jažici s dodanim antigenom u odnosu na očitano u jažici bez antigena veća od 0,5. Uz to razlika optičke gustoće očitane za pretraženi negativni serum između jažice s antigenom i jažice bez antigena mora biti manja od 0,1. Ukoliko su ovi kriteriji postignuti pretraga se smatra valjanom.

Rezultati pretraživanja uzoraka seruma interpretiraju se tako da se pozitivnim uzorkom seruma smatra svaki onaj kojemu je optička gustoća pretraživanja seruma u jažici plitice s antigenom u odnosu na vrijednost očitano u jažici plitice bez antigena veća od 0,15. Negativni su uzorci kojima je razlika u optičkoj gustoći očitanoj u jažici plitice s antigenom i jažici u plitici bez antigena manja od 0,1. Ukoliko je ova razlika za neki uzorak između 0,1 i 0,15, takav uzorak se smatra sumnjivim i potrebno ga je ponovo pretražiti. U slučaju da ponovnim pretraživanjem dobijemo sumnjiv rezultat preporuča se novo uzorkovanje od te životinje i pretraživanje novog uzorka.

#### **4.4.6. Određivanje podudarnosti rezultata pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK korištenjem različitih seroloških metoda**

Za određivanje podudarnosti između rezultata očitanih različitim metodama serološke dijagnostike izračunata je osjetljivost, specifičnost, podudarnost i pouzdanost rezultata postignutih različitim metodama dijagnostike uz uzimanje VN-testa kao zlatnog standarda u dijagnostici VAK. Za određivanje specifičnosti i osjetljivost te pouzdanosti rezultata komercijalnih ELISA kompleta u usporedbi s rezultatima postignutim VN-testom korišten je računalni program za evaluaciju dijagnostičkih testova dostupan na mrežnim stranicama (MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator. [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) (Verzija 20.110; pristup 1. lipnja 2022.)).

#### **4.5. Arhivski uzorci RNK virusa VAK**

Za filogenetsku analizu korišteni su arhivski uzorci ekstrahiranih RNK virusa arteritisa konja koji su dobiveni iz uzoraka ejakulata serološki pozitivnih pastuha zaprimljenih u laboratoriju u razdoblju od 2010. do 2013. godine. Po zaprimanju uzoraka ejakulata RNK EAV bila je ekstrahirana korištenjem komercijalnog kompleta QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) te načinjen postupak dokaza EAV lančanom reakcijom polimerazom usmjerenom na ORF 7 gen koji je odgovoran za kodiranje N proteina EAV prema ranije opisanoj metodi (BALASURIYA i sur., 2004.). Sve ekstrahirane RNK iz uzoraka koji su bili pozitivni navedenom metodom pohranjeni su pri -80 °C u arhivu Laboratorija ARTER.lab do provođenja ovog istraživanja. Sveukupno je u istraživanju korišteno 25 arhivskih uzoraka RNK.

#### **4.5.1. Lančana reakcija polimerazom s prethodnim prepisivanjem (RT-PCR)**

U ovom istraživanju je za molekularnu tipizaciju EAV dokazanih u istraživanom razdoblju na području RH korištena lančana reakcija polimerazom s prethodnim prepisivanjem (*engl.* Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction – RT-PCR) za ORF 5 gen EAV prema ranije opisanoj metodi (LAZIĆ i sur., 2017.) uz manje modifikacije opisane u nastavku.

##### **Pribor i oprema:**

- automatska pipeta zapremine 1 - 10  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta zapremine 10 - 100  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- automatska pipeta zapremine 100 - 1000  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- odgovarajući nastavci za pipete
- Eppendorf epruvete zapremine 2 ml
- Epruvetice za PCR zapremine 0,2 ml
- PCR uređaj (BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cycler, BioRad, Richmond, SAD)
- Sustav za provođenje elektroforeze (Scie - Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- Izvor električne struje (CS-300V) (Clever Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- Kadica za provođenje elektroforeze (Clever Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- Kalupi za agarozni gel s pripadajućim češljevima za jažice
- Parafinski film

- Staklena tikvica zapremnine 100 ml
- Mikrovalna pećnica
- Sustav za detekciju DNK pod ultraljubičastim svjetlom (Gel Doc 200, BioRad, Richmond, SAD)
- Mikrocentrifuga (Biofuge fresco) (Heraeus, Frankfurt, Njemačka)
- Tresilica (Rotamax 120) (Heidolph, Schwabach, Njemačka)

**Reagensi:**

- Agarozna u prahu (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Tris baza (Tris (hidroksimetil) aminometan) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ledena octena kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Boja za DNK u agaroznom gelu (GelStar, Lonza Rockland, SAD)
- Biljeg veličine DNK odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNK veličine po 100 pb (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- Otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo (Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)

**Početnice korištene u izvođenju molekularnih metoda (Bio Basic, Ontario, Kanada):**

Uzvodna: ORF 5F 5'-TACCGCTTGGTTTTGTGGCTAT-3'

Nizvodna: ORF 5R 5'-TCACCTAAAATCCCGTCACC-3'



### **Priprema radne otopine početnica za izvođenje molekularnih metoda:**

Svaka početnica je otopljena u vodi bez nukleaza do koncentracije 100 µmol/l. Zatim se tu otopinu razrijedilo do radne koncentracije 10 µmol/l.

### **4.5.2. RT-PCR za umnažanje virusne RNK**

#### **Reagensi:**

Otopina uzvodnih i nizvodnih početnica

Reagensi u sastavu komercijalnog kompleta za izvođenje RT-PCR reakcije QIAGEN®

OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka):

- Mješavina enzima (Omniscript i Sensiscript reverzna transkriptaza i HotStarTaq DNK polimeraza)
- Pufer sa uravnoteženim koncentracijama soli potrebnim za izvođenje RT-PCR reakcije
- Q-otopina
- Otopina deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- Voda bez nukleaza

#### **Priprema radnih otopina:**

Reakcijska smjesa za RT-PCR

**Reagensi:**

Za jedan uzorak bilo je potrebno:

5,4  $\mu$ l vode bez nukleaza

2,0  $\mu$ l pufera za RT-PCR reakciju (5x)

0,4  $\mu$ l dNTP smjese (10 mM)

0,5  $\mu$ l otopine uzvodne početnice ORF 5F (10 $\mu$ M)

0,5  $\mu$ l otopine nizvodne početnice ORF 5R (10 $\mu$ M)

0,4  $\mu$ l mješavine enzima (5 U/ $\mu$ l)

U epruvetu za PCR s reakcijskom smjesom dodano je 1  $\mu$ l izdvojene RNK. Izvođenje transkripcije virusne RNK u DNK i umnažanja segmenata genoma odvijalo se u PCR uređaju prema sljedećim optimiziranim uvjetima:

**Uvjeti izvođenja RT-PCR reakcije:**

50 °C, 30 minuta (reverzna transkripcija)

95 °C, 15 minuta (početna aktivacija enzima polimeraze)

35 ciklusa:

94 °C, 20 sekundi (denaturacija DNK lanaca)

60 °C, 1 minuta (vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza)

72 °C, 2 minuta (produljenje početnica)

72 °C, 9 minuta (konačno produljenje umnoženih sljedova DNK)

Po završetku PCR reakcije, dobiveni PCR proizvodi su pohranjeni u hladnjak, pri temperaturi 4 °C, do uporabe za drugi korak, umnažanja komplementarne cDNK.

#### **4.5.3. Umnažanje cDNK ORF 5 gena virusa VAK**

##### **Reagensi:**

Voda bez nukleaza

Otopina uzvodnih i nizvodnih početnica

Reagensi u sastavu komercijalnog kompleta za izvođenje TaKaRa Taq™ Hot Start Version (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan):

- Otopina deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5 mM
- Enzima Taq polimeraza 5 U/μl

10X PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) - Pufer sa uravnoteženim koncentracijama soli bez magnezija za izvođenje PCR reakcije, 10x koncentriran (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

MgCl<sub>2</sub> 25mM (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

##### **Priprema radnih otopina:**

Reakcijska smjesa za PCR

Reagensi:

Za jedan uzorak potrebno je:

5,6  $\mu\text{l}$  vode bez nukleaza

1,25  $\mu\text{l}$  pufera za PCR reakciju (10x)

0,75  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)

1,0  $\mu\text{l}$  dNTP smjese (25 mM)

0,625  $\mu\text{l}$  otopine uzvodne početnice ORF 5F (10 $\mu\text{M}$ )

0,625  $\mu\text{l}$  otopine nizvodne početnice ORF 5R (10 $\mu\text{M}$ )

0,15  $\mu\text{l}$  Enzima Taq polimeraze (5 U/ $\mu\text{l}$ )

U epruvetu se za svaki uzorak dodalo 2,5  $\mu\text{l}$  proizvoda RT-PCR reakcije i 10  $\mu\text{l}$  pripremljene reakcijske smjese za PCR. Izvođenje PCR reakcije odvija se u PCR uređaju prema sljedećim optimiziranim uvjetima:

Uvjeti izvođenja PCR reakcije:

95 °C , 5 minuta (početna aktivacija polimeraze)

40 ciklusa:

94 °C, 20 sekundi (denaturacija)

60 °C, 1 minut (spajanje početnica na ciljnu komplementarnu slijed baza)

72 °C, 3 minuta (produljenje početnica)

72 °C, 9 minuta (konačno produljenje umnoženih slijedova DNK).

Po završetku PCR reakcije, uzorci se pohranjuju u hladnjaku, pri temperaturi 4 °C do daljnje uporabe.

## **Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu**

### **Reagensi:**

- agarozna prašina i Tris baza (Tris (hidroksimetil) aminometan)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)
- ledena octena kiselina
- boja za DNK u agaroznom gelu
- biljeg veličine DNK odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNK veličine po 100 pb
- otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo

### **Priprema radnih otopina:**

#### **50X koncentrirana otopina TAE:**

##### Reagensi:

- Tris baza 242 g
- ledena octena kiselina 57,1 g
- EDTA (0,5 M) 100 ml
- destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerene su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici.

Vrijednost pH otopine bila je 8,5.

#### **0,5 M otopina EDTA:**

Reagensi:

- EDTA 186,1 g
- destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerene su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici.

Vrijednost pH otopine bila je 8,0.

#### **Agarozni gel:**

Reagensi:

- agarozu u prahu 0,7 g
- TAE pufer 75 ml
- boja za DNK 0,25  $\mu$ l

Gel je napravljen otapanjem 0,7 g agaroze u prahu u 75 ml TAE pufera. Otopina agaroze se zagrijala do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja agaroze i kratkotrajnog hlađenja gela dodala se boja za DNK u tekuću agarozu. Da bi se u gelu dobile jažice u još tekuću agarozu se stavio plastični češalj za formiranje jažica. Nakon polimerizacije

agaroze, uklonio se češalj za formiranje jažica i gel se stavio u kadu za elektroforezu u kojoj se nalazi TAE pufer.

Postupak izvođenja elektroforeze u agaroznom gelu bio je sljedeći. Na parafilmu se pomiješalo 3 µl svakog proizvoda PCR metode s 3 µl otopine brom fenol plavila. Mješavinu svakog uzorka mikropipetom se prenijelo u jažice gela. U jednu jažicu dodalo se biljeg veličine DNK odsječaka. Elektroforeza se provodila u uređaju za elektroforezu, pri naponu 100 V, jakosti struje 80 mA, u trajanju 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze prisutnost PCR proizvoda u gelu provjerila se pod UV svjetlom u komori za snimanje gelova, te se gel fotografirao pomoću kamere s filtrima za UV svjetlost koja je bila spojena s računalnim programom koji omogućuje pohranu fotografije, u svrhu dokumentiranja uspješnosti PCR reakcije.

#### **4.5.4. Određivanje nukleotidnih sljedova ORF 5 gena EAV dokazanih na području RH i filogenetska analiza**

Umnoženi nukleotidni sljedovi odsječaka ORF 5 gena EAV dokazanih na području RH na opisani način korišteni su za molekularnu tipizaciju i filogenetsku analizu EAV dokazanih na području RH u cilju dobivanja rezultata o molekularnoj epizootiologiji. Nukleotidni sljedovi ORF5 gena uslužno su određeni u tvrtki MacroGen Europe, Amsterdam, Nizozemska, pomoću ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, SAD) na uređaju 3730xl DNA Analyzer istog proizvođača, a korištene su identične početnice kao u opisanoj PCR metodi. Određeni nukleotidni sljedovi analizirani su pomoću računalnog programa MEGA 7 (KUMAR i sur., 2016.). Pomoću navedenog programa načinjeno je višestruko sravnjivanje DNK te su, koristeći metodu povezivanja susjednih nukleotidnih sljedova (*engl.* neighbour-joining, NJ) i

metodu najveće vjerojatnosti (*engl.* maximum likelihood, ML) nukleotidni sljedovi dobivenih odsječaka ORF 5 gena EAV dokazanih na području RH uspoređeni međusobno, kao i s dostupnim nukleotidnim sljedovima ORF 5 gena iz banke gena (GenBank) za EAV za koje je bila jasno navedena država i godina izdvajanja virusa. Ovim kriterijima ukupno je odgovaralo 138 nukleotidnih sljedova EAV izdvojenih u različitim državama u razdoblju od 1953. do 2014. godine.



## **5. REZULTATI**

### **5.1. Seroprevalencija VAK na području RH i na razini županija u razdoblju od 2010. do 2015. godine**

U istraživanom razdoblju ukupno je VN-testom na virusni arteritis konja serološki pretraženo 4475 uzoraka seruma kopitara. U daljnjem prikazu rezultata izuzeto je iz prikaza i analiza 30 uzoraka seruma zaprimljenih tijekom 2009. godine zbog razlika u načinu provođenja laboratorijskog pretraživanja koji je opisan u poglavlju Materijal i metode, te se u nastavku prikazuju rezultati za 4445 životinja pretraženih u razdoblju od 2010. do 2015. godine kako bi postignuti rezultati bili međusobno usporedivi.

Broj pretraženih životinja po godinama na razini cijele RH bio je najveći 2011. godine (859), a najmanji 2010. godine (558 uzoraka).

Uzorci seruma za serološko pretraživanje na virusni arteritis konja VN-testom u istraživanom razdoblju dostavljani su iz gotovo svih županija RH, od čega najveći broj iz Osječko-baranjske županije (1270 uzoraka), a uzorci nisu dostavljani u istraživanom razdoblju iz Dubrovačko-neretvanske županije.

Analizirajući broj pretraženih životinja po županijama na godišnjoj razini uočavamo da su uzorci dostavljani u razdoblju od 2010. do 2015. godine svake godine s područja 15 županija dok s područja županija Koprivničko-križevačke, Krapinsko-zagorske i Karlovačke uzorci nisu dostavljani pojedinih godina u obuhvaćenom istraživanju. S područja Zadarske županije uzorci nisu dostavljani tijekom 2012. i 2015. godine, a s područja Šibensko-kninske jedina tri uzorka dostavljena su 2013. godine dok s područja Dubrovačko-neretvanske županije nije dostavljen niti jedan uzorak.

Sveukupna seroprevalencija na području RH u razdoblju 2010. do 2015. godine iznosila je 17,5%, a po godinama je varirala od najviše 21,3% koja je zabilježena 2010. godine do najniže od 9,7% u 2015. godini.

Na županijskoj razini serološki pozitivne životinje potvrđene su na području 19 županija RH. Najviša seroprevalencija, u cijelom istraživanom razdoblju, zabilježena je u Vukovarsko-srijemskoj županiji (41,9%). U razdoblju od 2010. do 2015. godine serološki pozitivne životinje nisu dokazane jedino u Šibensko-kninskoj županiji, iz koje su zaprimljena samo tri uzorka, te Dubrovačko-neretvanskoj iz koje uzorci nisu niti dostavljani (Tablica 1.). Promatrajući kretanje seroprevalencije na razini županije, u istraživanom razdoblju, uz Vukovarsko-srijemsku (41,9%), najviše seroprevalencije su zabilježene u Osječko-baranjskoj (30,5%) te Požeško-slavonskoj županiji (27,9%). Najniža seroprevalencija u županijama s dokazanim infekcijama bila je u Istarskoj županiji (1,9%), a niska seroprevalencija zabilježena je i u Krapinsko-zagorskoj (2,8%) te Koprivničko-križevačkoj županiji (2,9%).

Najviša vrijednost seroprevalencije u pojedinoj godini na županijskoj razini zabilježena je na području Grada Zagreba 2010. godine kada su od sedam pretraženih životinja četiri bile pozitivne (57,1%). Iza toga slijedi Vukovarsko-srijemska županija sa seroprevalencijom od 55,6% tijekom 2015. godine i 50,0% 2012. godine. Ista vrijednost seroprevalencije, od točno 50,0%, zabilježena je i u Karlovačkoj županiji 2015. godine pretraživanjem osam životinja.

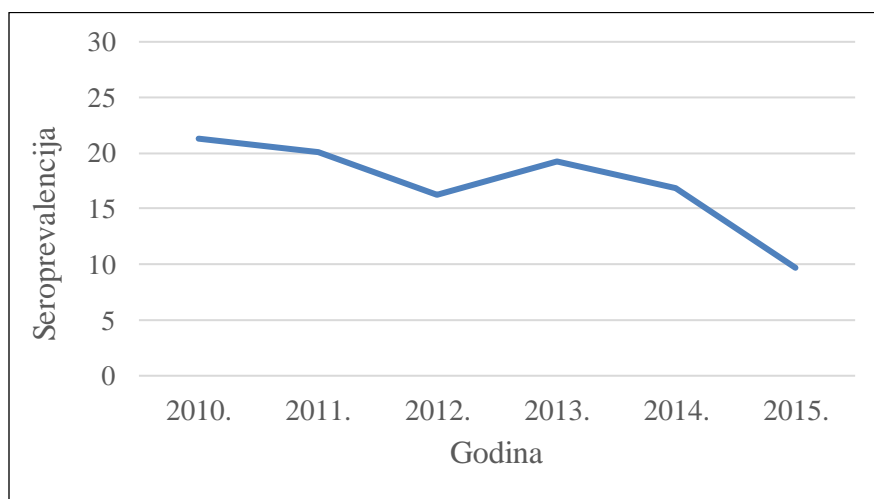
Pozitivne životinje potvrđivane su svake godine u sedam županija od kojih četiri iz Istočne Hrvatske (Vukovarsko-srijemska, Osječko-baranjska, Požeško-slavonska i Brodsko-posavska) te tri iz Središnje Hrvatske (Zagrebačka, Sisačko-moslavačka i Bjelovarsko-bilogorska).

**Tablica 1.** Seroprevalencija VAK na području RH i po županijama u razdoblju od 2009. do 2015. godine i ukupno u istraživanom razdoblju

Godina	2009.*		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO 2010.-2015.	
Županija	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)
VS	6/5	83,3	29/11	37,9	44/20	45,5	10/5	50,0	18/8	44,4	36/11	30,6	18/10	55,6	155/65	41,9
OB	7/7	100,0	216/77	35,6	225/69	30,7	201/66	32,8	171/79	46,2	267/71	26,6	190/25	13,2	1270/387	30,5
BP	4/2	50,0	39/4	10,3	53/9	17,0	37/11	29,7	69/19	27,5	69/3	4,3	62/7	11,3	329/53	16,1
PS	0/0	-	19/5	26,3	149/47	31,5	13/4	30,8	107/32	29,9	75/18	24,0	70/15	21,4	433/121	27,9
VP	0/0	-	8/0	0,0	10/0	0,0	25/2	8,0	39/5	12,8	11/0	0,0	16/0	0,0	109/7	6,4
KK	0/0	-	0/0	-	9/0	0,0	2/0	0,0	13/0	0,0	4/1	25,0	6/0	0,0	34/1	2,9
VŽ	0/0	-	1/0	0,0	7/1	14,3	5/0	0,0	3/0	0,0	5/0	0,0	3/0	0,0	24/1	4,2
ME	0/0	-	1/0	0,0	18/1	5,6	4/1	25,0	15/0	0,0	25/7	28,0	5/0	0,0	68/9	13,2
KZ	0/0	-	0/0	-	7/0	0,0	16/1	6,3	4/0	0,0	6/0	0,0	3/0	0,0	36/1	2,8
ZG	11/6	54,5	72/6	8,3	99/8	8,1	79/4	5,1	115/11	9,6	67/5	7,5	66/2	3,0	498/36	7,2
GZ	0/0	-	7/4	57,1	2/0	0,0	11/0	0,0	2/0	0,0	9/3	33,3	13/2	15,4	44/9	20,5
SM	0/0	-	66/2	3,0	152/3	2,0	146/3	2,1	135/4	3,0	150/18	12,0	115/2	1,7	764/32	4,2
KA	0/0	-	7/1	14,3	4/0	0,0	1/0	0,0	0/0	-	4/0	0,0	8/4	50,0	24/5	20,8
BB	0/0	-	43/3	7,0	48/10	20,8	52/4	7,7	72/3	4,2	56/4	7,1	66/1	1,5	337/25	7,4
IS	1/0	0,0	11/0	0,0	4/1	25,0	34/3	8,8	58/0	0,0	48/0	0,0	51/0	0,0	206/4	1,9
PG	0/0	-	22/2	9,1	4/1	25,0	5/0	0,0	1/0	0,0	1/0	0,0	3/0	0,0	36/3	8,3
LS	0/0	-	4/0	0,0	4/0	0,0	3/1	33,3	3/0	0,0	8/1	12,5	4/0	0,0	26/2	7,7
ZD	0/0	-	2/0	0,0	6/2	33,3	0/0	-	1/0	0,0	1/0	0,0	0/0	-	10/2	20,0
ŠK	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	3/0	0,0	0/0	-	0/0	-	3/0	0,0
SD	1/0	0,0	11/4	36,4	14/1	7,1	3/0	0,0	4/0	0,0	4/0	0,0	3/0	0,0	39/5	12,8
DN	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	0,0	0/0	0,0
<b>UKUPNO</b>	<b>30/20</b>	<b>66,7</b>	<b>558/119</b>	<b>21,3</b>	<b>859/173</b>	<b>20,1</b>	<b>647/105</b>	<b>16,2</b>	<b>833/161</b>	<b>19,3</b>	<b>846/142</b>	<b>16,8</b>	<b>702/68</b>	<b>9,7</b>	<b>4445/768</b>	<b>17,3</b>

N – broj uzoraka; P – broj pozitivnih; S (%) – seroprevalencija u postotcima; \* 2009. godina izuzeta iz ukupnog prikaza zbog razlika u načinu pretraživanja

**Kratice županija:** VS-Vukovarsko-srijemska, OB-Osječko-baranjska, BP-Brodsko-posavska, PS-Požeško-slavonska, VP-Virovitičko-podravska, KK-Koprivničko-križevačka, VŽ-Varaždinska, ME-Međimurska, KZ-Krapinsko-zagorska, ZG-Zagrebačka, GZ-Grad Zagreb, SM-Sisačko-moslavačka, KA-Karlovačka, BB-Bjelovarsko-bilogorska, IS-Istarska, PG-Primorsko-goranska, LS-Ličko-senjska, ZD-Zadarska, ŠK-Šibensko-knińska, SD-Splitsko-dalmatinska, DN-Dubrovačko-neretvanska



**Slika 17.** Grafički prikaz seroprevalencije virusnog arteritisa konja na području Republike Hrvatske u razdoblju 2010. – 2015. godine

## **5.2. Seroprevalencija VAK u regijama RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine**

Obzirom na neujednačen broj pretraženih životinja prema županijama te regionalne epizootiološke značajke konjogojstva, u svrhu analize postignutih rezultata županije su objedinjene u tri područja RH, Istočna Hrvatska, Središnja Hrvatska i Primorska Hrvatska.

Ukupno je s područja regije Istočna Hrvatska tijekom istraživnog razdoblja, od 2010. do 2015. godine, pretraženo sveukupno 2296 životinja od kojih je serološki pozitivno bilo 633 (27,6%). Broj uzoraka po godinama se kretao od 286 pretraženih tijekom 2012. godine do najvećeg od 481 pretraženih životinja prethodne 2011. godine. U ovoj regiji u istraživanom razdoblju seroprevalencija se kretala između najviše zabilježene 2013.

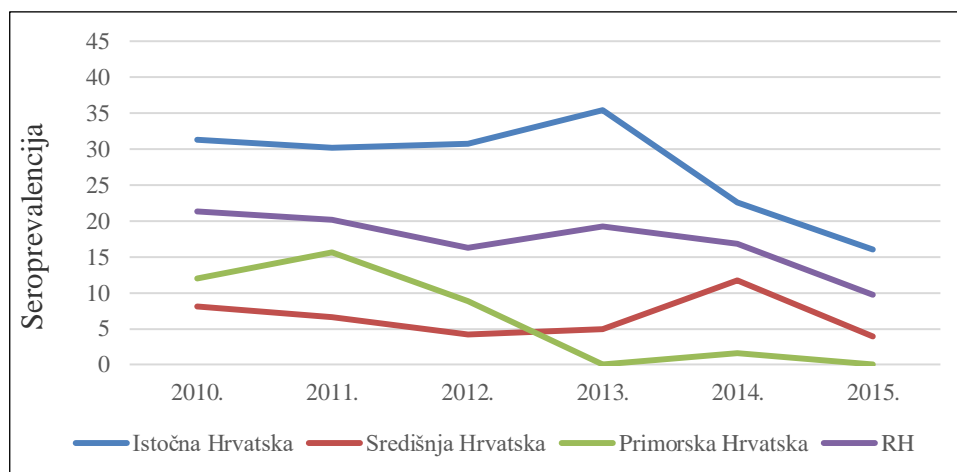
godine od 35,4% do najniže na kraju istraživanog razdoblja 2015. godine kada je iznosila 16,0%.

U regiji Središnja Hrvatska je tijekom istraživanog razdoblja ukupno pretraženo 1829 životinja od kojih je 119 bilo pozitivno što daje seroprevalenciju VAK od 6,5%. Broj uzoraka po godinama je bio najmanji 2010. godine (197), a najveći 2013. godine (359). Seroprevalencija se u istraživanom razdoblju kretala između najviše od 11,7% ustanovljene 2014. godine do najniže od 3,9% koja je potvrđena 2015. godine.

Najmanji broj životinja u istraživanom razdoblju pretražen je iz Primorske Hrvatske, sveukupno 320. Od navedenih 320 uzorka serološki pozitivno na VAK bilo je 16 što rezultira seroprevalencijom od 5,0%. Broj pretraženih životinja po godinama je bio od 32 životinje, 2011. godine do najvećeg 2013. godine kada je pretraženo 70 životinja. U istraživanom razdoblju najviša seroprevalencija od 15,6% zabilježena je 2011. godine dok 2013. i 2015. godine nisu ustanovljene serološki pozitivne životinje u Primorskoj Hrvatskoj (Tablica 2.).

Analizirajući podatke po regijama seroprevalencija je, u odnosu na onu u cijeloj RH, značajno viša cijelo istraživano razdoblje u Istočnoj Hrvatskoj, dok je u Središnjoj i Primorskoj Hrvatskoj značajno niža (Tablica 3.).

Seroprevalencija po pojedinim godinama istraživanja pokazuje sličan trend te je u Istočnoj Hrvatskoj u svakoj pojedinačnoj godini značajno viša u odnosu na sveukupnu seroprevalenciju u RH. U Središnjoj Hrvatskoj seroprevalencija je značajno niža u svakoj godini istraživanja u odnosu na RH. U Primorskoj Hrvatskoj je 2013. i 2014. godine značajno niža dok u preostale četiri godine razlika nije bila značajna (Tablica 3.).



**Slika 18.** Grafički prikaz seroprevalencije VAK prema regijama RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine

U odnosu na cjelokupnu seroprevalenciju VAK u Istočnoj Hrvatskoj vrijednost seroprevalencije po godinama se mijenjala na način da je statistički značajno viša bila tijekom 2013. godine da bi u posljednje dvije godine obuhvaćene istraživanjem bila značajno niža. Najniža vrijednost zabilježena je u posljednjoj istraživanoj godini (Tablica 4.). U Središnjoj Hrvatskoj seroprevalencija je kroz godine varirala bez statističke značajnosti do 2014. godine kada je statistički značajno viša (Tablica 4.). U Primorskoj Hrvatskoj uspoređujući seroprevalenciju u cjelokupnom razdoblju s onom određenom u pojedinoj godini zapaženo je statistički značajno odstupanje u 2011. godini kada je seroprevalencija od 15,6% bila značajno viša. Za ostale godine nije utvrđena značajna razlika (Tablica 4.).

Promatrajući korelaciju između ukupne seroprevalencije na području RH i one u istraživanim regijama, ustanovljeno je da postoji visoka korelacija između ukupne seroprevalencije i seroprevalencije u Istočnoj Hrvatskoj ( $r=0,86$ ;  $95\%CI=0,16-0,98$ ;  $p=0,03$ ). Za ostale regije nije ustanovljena značajna korelacija.

**Tablica 2.** Seroprevalencija VAK prema regijama RH po godinama od 2010. do 2015. godine i sveukupno u istraživanom razdoblju

<b>Godina</b>	<b>2010.</b>		<b>2011.</b>		<b>2012.</b>		<b>2013.</b>		<b>2014.</b>		<b>2015.</b>		<b>UKUPNO</b>	
<b>Regija</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>	<b>N/P</b>	<b>S (%)</b>
<b>Istočna Hrvatska</b>	311/97	31,2	481/145	30,1	286/88	30,8	404/143	35,4	458/103	22,5	356/57	16,0	2296/633	27,6
<b>Središnja Hrvatska</b>	197/16	8,1	346/23	6,6	316/13	4,1	359/18	5,0	326/38	11,7	285/11	3,9	1829/119	6,5
<b>Primorska Hrvatska</b>	50/6	12,0	32/5	15,6	45/4	8,9	70/0	0,0	62/1	1,6	61/0	0,0	320/16	5,0
<b>Hrvatska UKUPNO</b>	558/119	21,3	859/173	20,1	647/105	16,2	833/161	19,3	846/142	16,8	702/68	9,7	4445/768	17,3

N – broj uzoraka; P – broj pozitivnih; S (%) – seroprevalencija u postotcima

Istočna Hrvatska (VS, OB, BP, PS, VP), Središnja Hrvatska (KK, VŽ, ME, KZ, ZG, GZ, KA, SM, BB), Primorska Hrvatska (IS, PG, LS, ZD, ŠK, SD, DN)

**Tablica 3.** Seroprevalencija u pojedinoj regiji u odnosu na seroprevalenciju u RH u istoj godini istraživanja

Godina	2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
	95%CI		95%CI		95%CI		95%CI		95%CI		95%CI		95%CI	
Istočna Hrvatska	1,67 1,22- 2,29	<b>0,001</b>	1,71 1,32-2,21	<b>&lt;0,001</b>	2,29 1,65-3,18	<b>&lt;0,001</b>	2,29 1,75-2,99	<b>&lt;0,001</b>	1,44 1,08-1,91	<b>0,01</b>	1,78 1,22-2,59	<b>0,003</b>	1,82 1,62-2,06	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	0,33 0,19- 0,57	<b>&lt;0,001</b>	0,28 0,18-0,44	<b>&lt;0,001</b>	0,22 0,12-0,4	<b>&lt;0,001</b>	0,22 0,13-0,36	<b>&lt;0,001</b>	0,65 0,45-0,96	<b>0,03</b>	0,37 0,19-0,72	<b>0,002</b>	0,33 0,27-0,41	<b>&lt;0,001</b>
Primorska Hrvatska	0,5 0,21- 1,21	0,12	0,73 0,29-1,93	0,53	0,5 0,18-1,44	0,19	0,03 0,002-0,48	<b>0,01</b>	0,08 0,01-0,59	<b>0,01</b>	0,08 0,005-1,23	0,07	0,25 0,15-0,42	<b>&lt;0,001</b>

OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p - vjerojatnost



**Tablica 4.** Godišnja seroprevalencija u pojedinoj regiji u usporedbi sa seroprevalencijom u istoj regiji tijekom cijelog istraživanog razdoblja (2010.-2015.)

Godina	2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.	
Regija	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
	95%CI		95%CI		95%CI		95%CI		95%CI		95%CI	
Istočna Hrvatska	1,19 0,92-1,54	0,18	1,13 0,91-1,41	0,25	1,17 0,89-1,53	0,26	1,44 1,15-1,8	<b>0,001</b>	0,76 0,6-0,97	<b>0,03</b>	0,5 0,37-0,67	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	1,27 0,74-2,19	0,39	1,02 0,64-1,62	0,1	0,62 0,34-1,12	0,11	0,76 0,46-1,26	0,29	1,9 1,29-2,79	<b>0,001</b>	0,58 0,31-1,08	0,09
Primorska Hrvatska	2,59 0,96-6,97	0,06	3,52 1,2-10,35	<b>0,02</b>	1,85 0,59-5,81	0,29	0,13 0,008-2,21	0,16	0,31 0,04-2,39	0,26	0,15 0,009-2,53	0,19

OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p - vjerojatnost

### **5.3. Seroprevalencija VAK ovisno o dobi i regijama pretraženih životinja**

Za određivanje kretanja seroprevalencije kroz godine istraživanog razdoblja ovisno o dobi životinja kao i razlike u seroprevalenciji dobnih skupina u različitim regijama RH koristili smo rezultate pretraživanja životinja za koje je u popratnom obrascu dob bila jasno istaknuta. Stoga je ovom analizom obuhvaćeno sveukupno 2568 životinja od čega najveći broj iz Istočne Hrvatske (1340), zatim Središnje Hrvatske (1075), te najmanji broj iz Primorske Hrvatske (153 pretražene životinje) (Tablica 5.).

Sveukupna seroprevalencija u životinja obuhvaćenih ovim dijelom istraživanja iznosila je 16,9% s najvišom u Istočnoj Hrvatskoj (26,3%), zatim Središnjoj Hrvatskoj (6,9%) te najnižom zabilježenom u Primorskoj Hrvatskoj (3,9%) (Tablica 5.).

Uspoređujući seroprevalencije po dobnim skupinama na području cijele RH najviša seroprevalencija ustanovljena je u životinja u dobi iznad 10 godina (41,0%), zatim u skupini životinja u dobi od 5 do 10 godina (12,0%) te najniža u životinja mlađih od 5 godina (5,4%) (Tablica 5.).

Analizirajući rezultate po regijama, uočene su razlike te je seroprevalencija u Istočnoj Hrvatskoj bila najviša u skupini životinja starijih od 10 godina (56,2%), zatim niža u životinja u dobi od 5 do 10 godina (20,9%) te najniža u životinja mlađih od 5 godina (6,7%). U Središnjoj Hrvatskoj seroprevalencija je također bila viša u životinja starijih od 10 godina (18,0%) dok je niža bila u skupinama od 5 do 10 godina (5,0%) i skupini životinja mlađih od pet godina (3,8%). U Primorskoj Hrvatskoj je također najviša seroprevalencija bila u skupini životinja u dobi iznad 10 godina (6,5%), nešto niža u životinja mlađih od 5 godina (4,1%), a najniža u dobnoj skupini između 5 i 10 godina

(1,7%) u kojoj je zabilježena samo jedna pozitivna životinja u istraživanom razdoblju (Tablica 5.).

Godišnja seroprevalencija u populaciji konja obuhvaćenoj ovom analizom varirala je od 19,9% koliko je iznosila 2010. godine do najniže od 12,7% zabilježene u 2015. godini (Tablica 5.).

U Istočnoj Hrvatskoj je seroprevalencija varirala od 35,4% 2013. godine do najniže 18,5% 2015. godine. U Središnjoj Hrvatskoj najviša seroprevalencija je iznosila 9,9% 2010. godine, a najniža 2015. godine kada je bila 4,6%. Za razliku od navedenog, u Primorskoj Hrvatskoj seroprevalencija je bila približno ujednačena u 2010. godini (10,0%), 2011. godini (14,3%) i 2012. godini (10,7%). U razdoblju od 2013. do 2015. godine nisu dokazane pozitivne životinje (Tablica 5.).

Uspoređujući seroprevalenciju VAK u Republici Hrvatskoj i onu u pojedinim dobnim skupinama statistički je značajno veća seroprevalencija u životinja starijih od 10 godina te značajno manja u druge dvije dobne skupine. Ovakav rezultat za životinje starije od 10 godina se potvrđuje i u svakoj pojedinoj godini obuhvaćenoj istraživanjem, kao i statistički značajno niža seroprevalencija u životinja mlađih od 5 godina. Za razliku od njih u životinja u dobi od 5 do 10 godina seroprevalencija je bila statistički značajno niža u odnosu na ukupnu populaciju 2011., 2014. i 2015. godine dok značajnost nije uočena u preostale tri godine (Tablica 6.).

U cijelom istraživanom razdoblju u Istočnoj Hrvatskoj seroprevalencija je bila značajno viša u dobi iznad 10 godina, te značajno niža u druge dvije dobne skupine. Analizirajući rezultate po godinama, uočeno je da je u svakoj godini seroprevalencija bila značajno viša u životinja starijih od 10 godina te niža u onih mlađih od 5 godina. U životinja u dobi od

5 do 10 godina statistički značajno niža seroprevalencija uočena je samo tijekom posljednje dvije godine istraživanja (Tablica 6.).

U Središnjoj Hrvatskoj dokazano je da je seroprevalencija značajno viša u životinja starijih od 10 godina dok za preostale dvije skupine nema statističke značajnosti. Uspoređujući podatke po pojedinim godinama uočljivo je da je seroprevalencija statistički značajno viša u životinja starijih od 10 godina u razdoblju od 2010. do 2013. godine nakon čega nema značajnih razlika po dobi (Tablica 6.).

U Primorskoj Hrvatskoj u cijelom promatranom razdoblju, kao i svaku godinu zasebno, nisu uočene statistički značajne razlike u seroprevalenciji između dobnih skupina (Tablica 6.).

Uspoređeni su podaci o seropozitivnim životinjama i dobnim skupinama na području cijele RH s podacima iz različitih regija u pojedinoj godini istraživanja. Tako nisu uočene značajne razlike tijekom 2010. godine da bi tijekom 2011. godine potvrdili značajno veću prevalenciju u životinja u dobi od 5 do 10 godina u Istočnoj Hrvatskoj. Iste godine uočena je i značajno niža seroprevalencija u životinja u dobi od 5 do 10 godine te životinja starijih od 10 godina u Središnjoj Hrvatskoj (Tablica 7.). Sljedeće, 2012. godine, značajno je viša seroprevalencija zabilježena u Istočnoj Hrvatskoj u životinja od 5 do 10 i starijih od 10 godina te značajno niža u životinja u dobi od 5 do 10 godina u Središnjoj Hrvatskoj kao i starijih od 10 godina u Primorskoj Hrvatskoj (Tablica 7.). Značajno viša seroprevalencija zabilježena je i tijekom 2013. godine u Istočnoj Hrvatskoj u dobi od 5 do 10 godina, ali i u životinja mlađih od 5 godina, dok je treću godinu uzastopce seroprevalencija u životinja u dobi od 5 do 10 godina u Središnjoj Hrvatskoj bila značajno niža (Tablica 7.). Tijekom 2014. godine seroprevalencija je bila značajno viša u Istočnoj Hrvatskoj u životinja starijih od 10 godina te značajno niža u istoj dobnoj skupini u

Središnjoj Hrvatskoj, dok za ostale dobne skupine i regije nije bilo značajnosti. Identičan rezultat je zabilježen i u posljednjoj godini obuhvaćenoj istraživanjem (Tablica 7.).

Analizirajući značajnost razlika u pojedinoj regiji uočljivo je da su u Istočnoj Hrvatskoj značajno češće pozitivne bile životinje u dobi od 5 do 10 godina u razdoblju od 2011. do 2013. godine, a u dobi iznad 10 godina posljednje dvije godine istraživanja (Tablica 7.).

**Tablica 5.** Seroprevalencija VAK prema dobi i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015.

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Dob	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)	N/P	SE (%)
Istočna Hrvatska	<5	30/2	6,7	94/9	9,6	71/3	4,2	58/9	15,5	88/5	5,7	91/1	1,1	432/29	6,7
	5-10	81/21	25,9	102/22	21,6	86/23	26,7	80/27	33,8	84/9	10,7	94/8	8,5	527/110	20,9
	>10	40/20	50,0	82/49	59,8	45/31	68,9	74/39	52,7	66/36	54,5	74/39	52,7	381/214	56,2
	<b>Ukupno</b>	151/43	28,5	278/80	28,8	202/57	28,2	212/75	35,4	238/50	21,0	259/48	18,5	1340/353	26,3
Središnja Hrvatska	<5	45/0	0,0	78/5	6,4	52/1	1,9	77/1	1,3	28/4	14,3	33/1	3,0	313/12	3,8
	5-10	60/7	11,7	97/4	4,1	121/4	3,3	131/8	6,1	87/4	4,6	83/2	2,4	579/29	5,0
	>10	16/5	31,3	27/7	25,9	42/7	16,7	34/7	20,6	29/3	10,3	35/4	11,4	183/33	18,0
	<b>Ukupno</b>	121/12	9,9	202/16	7,9	215/12	5,6	242/16	6,6	144/11	7,6	151/7	4,6	1075/74	6,9
Primorska Hrvatska	<5	5/1	20,0	6/1	16,7	6/0	0,0	22/0	0,0	6/0	0,0	4/0	0,0	49/2	4,1
	5-10	2/0	0,0	4/0	0,0	10/1	10,0	21/0	0,0	11/0	0,0	10/0	0,0	58/1	1,7
	>10	3/0	0,0	4/1	25,0	12/2	16,7	10/0	0,0	9/0	0,0	8/0	0,0	46/3	6,5
	<b>Ukupno</b>	10/1	10,0	14/2	14,3	28/3	10,7	53/0	0,0	26/0	0,0	22/0	0,0	153/6	3,9
Republika Hrvatska	<5	80/3	3,8	178/15	8,4	129/4	3,1	157/10	6,4	122/9	7,4	128/2	1,6	794/43	5,4
	5-10	143/28	19,6	203/26	12,8	217/28	12,9	232/35	15,1	182/13	7,1	187/10	5,3	1164/140	12,0
	>10	59/25	42,4	113/57	50,4	99/40	40,4	118/46	39,0	104/39	37,5	117/43	36,8	610/250	41,0
	<b>Ukupno</b>	282/56	19,9	494/98	19,8	445/72	16,2	507/91	17,9	408/61	15,0	432/55	12,7	2568/433	16,9

N – broj uzoraka; P – broj pozitivnih; SE (%) – seroprevalencija u postotcima; <5 – životinje mlađe od 5 godina; 5-10 – životinje u dobi od 5 do 10 godina; >10 – životinje starije od 10 godina

**Tablica 6.** Značaj seroprevalencije VAK u pojedinim dobnim skupinama u odnosu na ukupnu seroprevalenciju u pojedinoj godini u istoj regiji

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Dob	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	<5	0,18 0,04-0,79	<b>0,02</b>	0,26 0,13-0,55	<b>&lt;0,001</b>	0,11 0,03-0,37	<b>&lt;0,001</b>	0,34 0,16-0,72	<b>0,005</b>	0,27 0,08-0,59	<b>0,002</b>	0,05 0,01-0,36	<b>0,003</b>	0,2 0,14-0,3	<b>&lt;0,001</b>
	5-10	0,88 0,48-1,62	0,68	0,68 0,4-1,17	0,16	0,93 0,53-1,64	0,80	0,93 0,54-1,6	0,79	0,45 0,21-0,96	<b>0,04</b>	0,41 0,19-0,9	<b>0,03</b>	0,74 0,58-0,94	<b>0,01</b>
	>10	2,51 1,23-5,13	<b>0,01</b>	3,68 2,2-6,13	<b>&lt;0,001</b>	5,63 2,79-11,36	<b>&lt;0,001</b>	2,04 1,19-3,48	<b>0,009</b>	4,51 2,54-8,02	<b>&lt;0,001</b>	4,9 2,82-8,52	<b>&lt;0,001</b>	3,58 2,83-4,54	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	<5	0,07 0,01-1,66	0,11	0,8 0,28-2,25	0,67	0,33 0,04-2,61	0,29	0,19 0,02-1,43	0,11	2,02 0,59-6,85	0,26	0,64 0,08-5,41	0,68	0,54 0,29-1,01	0,05
	5-10	1,2 0,45-3,22	0,72	0,5 0,16-1,54	0,23	0,58 0,18-1,83	0,35	0,92 0,38-2,21	0,85	0,58 0,18-1,89	0,37	0,51 0,1-2,5	0,41	0,71 0,46-1,11	0,13
	>10	4,13 1,23-13,9	<b>0,02</b>	4,07 1,5-11,07	<b>0,006</b>	3,38 1,25-9,19	<b>0,02</b>	3,66 1,38-9,7	<b>0,009</b>	1,4 0,36-5,35	0,63	2,65 0,73-9,63	0,14	2,98 1,91-4,64	<b>&lt;0,001</b>
Primorska Hrvatska	<5	2,25 0,11-45,73	0,6	1,2 0,09-16,44	0,89	0,56 0,03-12,27	0,71	2,38 0,05-123,59	0,67	4,08 0,07-225,45	0,49	5 0,09-286-57	0,44	1,04 0,2-5,34	0,96
	5-10	1,27 0,04-41,56	0,89	0,56 0,02-13,93	0,72	0,93 0,09-10,09	0,95	2,49 0,05-129,47	0,65	2,3 0,04-123,4	0,68	2,14 0,04-115,58	0,71	0,43 0,05-3,65	0,44
	>10	0,9 0,03-27,86	0,95	2 0,13-30,16	0,62	1,67 0,24-11,53	0,60	5,1 0,1-271,44	0,42	2,79 0,05-150,7	0,61	2,65 0,05-144,33	0,63	1,71 0,41-7,12	0,46
Republika Hrvatska	<5	0,16 0,05-0,52	<b>0,002</b>	0,37 0,21-0,66	<b>&lt;0,001</b>	0,17 0,06-0,46	<b>&lt;0,001</b>	0,3 0,15-0,6	<b>&lt;0,001</b>	0,45 0,22-0,94	<b>0,03</b>	0,11 0,03-0,45	<b>0,002</b>	0,28 0,2-0,39	<b>&lt;0,001</b>
	5-10	0,98 0,59-1,63	0,95	0,59 0,37-0,95	<b>0,03</b>	0,77 0,48-1,23	0,27	0,79 0,52-1,21	0,27	0,44 0,23-0,82	<b>0,01</b>	0,39 0,19-0,78	<b>0,008</b>	0,67 0,55-0,83	<b>&lt;0,001</b>
	>10	2,97 1,64-5,37	<b>&lt;0,001</b>	4,11 2,68-6,32	<b>&lt;0,001</b>	3,51 2,19-5,64	<b>&lt;0,001</b>	2,84 1,84-4,38	<b>&lt;0,001</b>	3,41 2,11-5,52	<b>&lt;0,001</b>	3,98 2,49-6,38	<b>&lt;0,001</b>	3,42 2,83-4,15	<b>&lt;0,001</b>

OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost

**Tablica 7.** Značaj seroprevalencije VAK za dobne skupine u pojedinoj regiji u odnosu na prosjek seroprevalencije dobne skupine na području RH u istoj godini

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Dob	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	<5	1,83 0,29- 11,55	0,65	1,15 0,48-2,74	0,75	1,38 0,3-6,34	0,68	2,7 1,04-7,03	<b>0,04</b>	0,76 0,24-2,34	0,63	0,7 0,06-7,84	0,77	1,26 0,77-2,04	0,36
	5-10	1,44 0,75-2,74	0,27	1,87 1,001-3,5	<b>0,0497</b>	2,46 1,32-4,59	<b>0,004</b>	2,87 1,6-5,15	<b>&lt;0,001</b>	1,56 0,64-3,81	0,33	1,65 0,63-4,32	0,31	1,93 1,47-2,54	<b>&lt;0,001</b>
	>10	1,36 0,61-3,05	0,46	1,46 0,82-2,59	0,2	3,27 1,55-6,9	<b>0,002</b>	1,74 0,97-3,14	0,06	2 1,07-3,74	<b>0,03</b>	1,92 1,06-3,46	<b>0,03</b>	1,85 1,42-2,39	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	<5	0,24 0,01-4,82	0,35	0,74 0,26-2,13	0,58	0,61 0,07-5,62	0,66	0,19 0,02-1,54	0,12	2,09 0,6-7,36	0,25	1,97 0,17-22,4	0,55	0,7 0,36-1,34	0,28
	5-10	0,54 0,22-1,32	0,18	0,29 0,1-0,86	<b>0,03</b>	0,23 0,08-0,67	<b>0,007</b>	0,37 0,16-0,82	<b>0,01</b>	0,63 0,2-1,98	0,43	0,44 0,09-2,04	0,29	0,39 0,26-0,58	<b>&lt;0,001</b>
	>10	0,62 0,19-2	0,42	0,34 0,13-0,88	<b>0,03</b>	0,44 0,16-1,21	0,11	0,41 0,16-1,01	0,05	0,19 0,05-0,68	<b>0,01</b>	0,22 0,07-0,67	<b>0,007</b>	0,32 0,21-0,48	<b>&lt;0,001</b>
Primorska Hrvatska	<5	6,42 0,54- 76,35	0,14	2,17 0,24- 19,84	0,49	2,15 0,1-44,24	0,62	0,31 0,02-5,51	0,43	0,92 0,05- 17,59	0,96	5,62 0,23-135,02	0,29	0,74 0,17-3,16	0,69
	5-10	0,81 0,04- 17,36	0,89	0,74 0,04- 14,22	0,84	0,75 0,09-6,15	0,79	0,13 0,01-2,18	0,16	0,55 0,03-9,78	0,68	0,81 0,04-14,7	0,88	0,13 0,02-0,93	<b>0,04</b>
	>10	0,19 0,01-3,91	0,28	0,33 0,03-3,24	0,34	0,18 0,04-0,85	<b>0,03</b>	0,07 0,004-1,3	0,07	0,09 0,005- 1,54	0,1	0,1 0,01-1,79	0,12	0,1 0,03-0,33	<b>&lt;0,001</b>

OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost



#### **5.4. Seroprevalencija VAK prema spolu i regijama pretraženih životinja**

Analiza seroprevalencije VAK u razdoblju 2010. – 2015. vezano uz spol na području cijele RH kao i na regionalnoj razini načinjena je temeljem analize podataka pretraživanja svih životinja za koje je u popratnom obrascu bio jasno naznačen spol. Ovom je analizom obuhvaćeno 3828 životinja.

Ukupno je analizirano 2838 muških i 990 ženskih životinja. Od navedenog broja 1829 životinja su iz Istočne Hrvatske (1137 muških i 692 ženskih), 1678 iz Središnje Hrvatske (1456 muških i 222 ženskih) te 321 iz Primorske Hrvatske (245 muških i 76 ženskih) (Tablica 8.).

Seroprevalencija u analiziranoj skupini je 15,9%. Najviša je bila u Istočnoj Hrvatskoj (26,5%), zatim u Središnjoj (6,6%) te najniža u Primorskoj Hrvatskoj (4,0%). Ovisno o spolu, seroprevalencija je bila 9,7% u muških životinja i 33,4% u ženskih. Ovakav veći udio serološki pozitivnih ženskih životinja zabilježen je u svim regijama (Tablica 8.). U ženskih životinja najviša seroprevalencija je zabilježena 2013. godine (54,2%), a najniža 2014. godine (23,1%) iza koje slijedi 2015. godina sa seroprevalencijom od 24,1% (Tablica 8.). Seroprevalencija, ovisno o godini, se u muških životinja kretala od najviše 21,6% u 2010. godini do najniže od 4,8% u posljednjoj godini obuhvaćenoj istraživanjem. Analizirajući podatke kroz godine u pojedinim regijama ustanovljeno je da je u Istočnoj Hrvatskoj seroprevalencija u muških životinja varirala od 33,1% 2010. godine do najniže 8,3% ustanovljene 2015. godine. U ženskih životinja najviša je bila 2013. godine (60,3%), a najniža 2014. godine (25,4%). U Središnjoj Hrvatskoj najviša seroprevalencija je u muških životinja bila 10,3% tijekom 2010. godine dok je najniža zabilježena u posljednjoj

godini obuhvaćenoj istraživanjem i iznosila je 2,9%. Iste, 2015. godine, zabilježena je najniža seroprevalencija i u ženskih životinja (6,5%) dok je najviša od 40,0% zabilježena 2010. godine. Najviša seroprevalencija u muških životinja u Primorskoj Hrvatskoj zabilježena je 2011. godine (14,3%) dok 2010., 2013. i 2015. nisu potvrđene serološki pozitivne muške životinje. Serološki pozitivne ženske životinje dokazivane su od 2010. do 2012. godine uz najvišu seroprevalenciju od 33,3% 2011. godine te najnižu od 6,3% 2010. godine. Seroprevalencija 2012. iznosila je 16,7%, a u razdoblju od 2013. do 2015. nije bilo serološki pozitivnih ženskih životinja (Tablica 8.). Viša seroprevalencija u ženskih u odnosu na muške životinje zabilježena je na području cijele RH kao i u svakoj regiji u cijelom razdoblju istraživanja. Također je ovakav rezultat zabilježen i za svaku godinu obuhvaćenu istraživanjem na području RH, kao i svaku godinu u Istočnoj i Središnjoj Hrvatskoj. U Primorskoj Hrvatskoj za godine kada su dokazivane pozitivne životinje oba spola (2011. i 2012.), viša seroprevalencija je bila također u ženskih životinja dok su 2010. bile pozitivne samo tri ženske, a 2014. jedna muška životinja (Tablica 8.).

Statistička analiza potvrdila je da ženke imaju značajno veći izgled biti serološki pozitivne kako na području RH tako i u svakoj pojedinoj regiji (Tablica 9.). Ovakva značajnost izgleda potvrđena je i za svaku pojedinu godinu obuhvaćenu istraživanjem na razini RH te u Istočnoj Hrvatskoj. U preostale dvije regije značajnost utjecaja spola potvrđena je u Središnjoj Hrvatskoj 2010., 2011. i 2012. godine. U Primorskoj Hrvatskoj značajnost utjecaja spola na ishod serološkog pretraživanja po godinama nije dokazan (Tablica 9.).

**Tablica 8.** Seroprevalencija VAK prema spolu i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015.

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Spol	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)
Istočna Hrvatska	M	139/46	33,1	221/40	18,1	147/28	19,0	189/30	15,9	236/29	12,3	205/17	8,3	1137/190	16,7
	Ž	72/41	56,9	115/60	52,2	110/44	40,0	126/76	60,3	142/36	25,4	127/37	29,1	692/294	42,5
<b>Ukupno</b>		211/87	41,2	336/100	29,8	257/72	28,0	315/106	33,7	378/65	17,2	332/54	16,3	1829/484	26,5
Središnja Hrvatska	M	116/12	10,3	242/12	5,0	258/8	3,1	329/16	4,9	272/26	9,6	239/7	2,9	1456/81	5,6
	Ž	10/4	40,0	81/10	12,3	45/5	11,1	17/2	11,8	38/6	15,8	31/2	6,5	222/29	13,1
<b>Ukupno</b>		126/16	12,7	323/22	6,8	303/13	4,3	346/18	5,2	310/32	10,3	270/9	3,3	1678/110	6,6
Primorska Hrvatska	M	13/0	0,0	14/2	14,3	32/2	6,3	69/0	0,0	60/1	1,7	57/0	0,0	245/5	2,0
	Ž	48/3	6,3	9/3	33,3	12/2	16,7	1/0	0,0	2/0	0,0	4/0	0,0	76/8	10,5
<b>Ukupno</b>		61/3	4,9	23/5	21,7	44/4	9,1	70/0	0,0	62/1	1,6	61/0	0,0	321/13	4,0
Republika Hrvatska	M	268/58	21,6	477/54	11,3	437/38	8,7	587/46	7,8	568/56	9,9	501/24	4,8	2838/276	9,7
	Ž	130/48	36,9	205/73	35,6	167/51	30,5	144/78	54,2	182/42	23,1	162/39	24,1	990/331	33,4
<b>UKUPNO</b>		398/106	26,6	682/127	18,6	604/89	14,7	731/124	17,0	750/98	13,1	663/63	9,5	3828/607	15,9

N – broj uzoraka; P – broj pozitivnih; S (%) – seroprevalencija u postotcima; M – muški; Ž - ženski

**Tablica 9.** Utjecaj spola na seroprevalenciju VAK u pojedinim godinama obuhvaćenim istraživanjem i sveukupno u istraživanom razdoblju 2010. – 2015.

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Spol	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ž	2,67 1,49-4,8	<b>0,001</b>	4,94 3-8,15	<b>&lt;0,001</b>	2,83 1,62-4,97	<b>&lt;0,001</b>	8,06 4,75-13,67	<b>&lt;0,001</b>	2,42 1,41-4,17	<b>0,001</b>	4,55 2,43-8,51	<b>&lt;0,001</b>	3,68 2,96-4,57	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ž	5,78 1,43-23,41	<b>0,01</b>	2,7 1,12-6,51	<b>0,03</b>	3,91 1,22-12,54	<b>0,02</b>	2,61 0,55-12,4	0,23	1,77 0,68-4,64	0,24	2,65 0,52-13,46	0,24	2,55 1,63-4,0	<b>&lt;0,001</b>
Primorska Hrvatska	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ž	2,08 0,1-42,77	0,64	3 0,39-23,07	0,29	3 0,37-24,17	0,3	46,33 0,67-3217,85	0,08	7,93 0,25-247,84	0,24	12,78 0,23-723	0,22	5,65 1,79-17,82	<b>0,003</b>
Republika Hrvatska	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ž	2,12 1,34-3,36	<b>0,001</b>	4,33 2,9-6,48	<b>&lt;0,001</b>	4,62 2,89-7,37	<b>&lt;0,001</b>	13,9 8,91-21,69	<b>&lt;0,001</b>	2,74 1,76-4,27	<b>&lt;0,001</b>	6,3 3,65-10,88	<b>&lt;0,001</b>	4,66 3,89-5,59	<b>&lt;0,001</b>

OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost, M – muški, Ž – ženski

## **5.5. Seroprevalencija VAK prema kategoriji i regijama pretraženih životinja**

Prema kategoriji životinja analizirani su svi popratni obrasci pristigli uz uzorke za serološko pretraživanje na VAK te su sve životinje s jasno naznačenom kategorijom razvrstane u skupine pastusi, kobile i objedinjenu kategoriju ždrijebadi i omadi.

Sveukupno se kategorija jednoznačno mogla odrediti za 3795 životinja serološki pretraženih na VAK u razdoblju od 2010. do 2015. godine. Od toga pretraženo je 2734 pastuha, 926 kobila te 135 životinja iz kategorije ždrijebadi i omadi. Sveukupna seroprevalencija u ovoj skupini životinja iznosila je 15,1%. Na području cijele RH najviša je bila u kobila (33,7%), zatim pastuha (9,2%) te najniža u ždrijebadi i omadi (6,7%) (Tablica 10.). Na godišnjoj razini seroprevalencija je svake godine bila najviša u kobila. U tri godine sa zabilježenim pozitivnim životinjama u sve tri kategorije, dvije godine je seroprevalencija bila viša u ždrijebadi i omadi u odnosu na pastuhe (2012. i 2013.), a 2011. je bila viša u pastuha (Tablica 10.).

U Istočnoj Hrvatskoj kategorija se mogla odrediti za 1794 životinje (1077 pastuha, 634 kobile i 83 ždrijebeta/ometa). Seroprevalencija je u cijelom istraživanom razdoblju bila najviša u kobila (43,4%), zatim pastuha (15,6%) te najniža u kategoriji ždrijebadi i omadi (7,2%) (Tablica 10.). Ovakav trend je potvrđen i na godišnjoj razini jer je svake godine seroprevalencija bila najviša u kobila, a najniža u ždrijebadi i omadi (Tablica 10.).

U Središnjoj Hrvatskoj ovom analizom obuhvaćeno je 1719 životinja. U kategoriji pastuha u 1415 jedinki seroprevalencija VAK je bila 5,5%, a u 254 kobila seroprevalencija je iznosila 11,0%. Najmanji broj životinja u Središnjoj Hrvatskoj pretražen je iz kategorije ždrijebadi i omadi. Seroprevalencija VAK u njih je cijelom

istraživanom razdoblju iznosila 6,0%. Po godinama istraživanja najviša seroprevalencija je zabilježena u pastuha 2010. godine, ždrijebadi i omadi sljedeće godine te kobila u preostalim godinama obuhvaćenim istraživanjem (Tablica 10.).

U Primorskoj Hrvatskoj se kategorija mogla odrediti za sveukupno 282 životinje, od čega 242 pastuha, 38 kobila i dvije životinje iz kategorije ždrijebad i omad. Seroprevalencija je u kobila u ovom dijelu RH bila 23,7%, u pastuha 2,1%, a obje životinje iz kategorije ždrijebadi i omadi bile su negativne (Tablica 10.).

Uspoređujući seroprevalencije po godinama na području RH seroprevalencija je u pastuha varirala od najviše ustanovljene 2010. godine koja je iznosila 16,1% do najniže u posljednjoj godini obuhvaćenom istraživanjem kada je bila 4,9%. U kobila se kretala između 56,7% 2014. godine do najniže od 24,4% godinu kasnije. U kategoriji ždrijebadi i omadi pozitivne životinje su potvrđivane od 2011. do 2013. uz seroprevalencije od 9,5% 2012. godine do 12,8% 2013. godine te 10,5% 2011. godine (Tablica 10.).

Na regionalnoj razini seroprevalencija u pastuha u Istočnoj Hrvatskoj kretala su se od 22,0% u prvoj godini obuhvaćenom istraživanjem do 8,6% na kraju istraživanog razdoblja. U kobila u istoj regiji najviša seroprevalencija od 63,8% zabilježena je 2013. godine dok je najniža od 27,1% bila sljedeće, 2014. godine. Pozitivna ždrijebad dokazivana je 2012. i 2013. godine uz seroprevalenciju od 9,1% te 15,2% (Tablica 10.).

U Središnjoj Hrvatskoj seroprevalencija u pastuha se kretala od 12,9% 2010. godine do najniže od 2,8% 2012. godine, a kobila između 6,5% koliko je iznosila u prvoj i posljednjoj godini obuhvaćenom istraživanjem, do najviše 16,2% 2014. godine. U kategoriji ždrijebadi i omadi pozitivne životinje su dokazivane 2011. i 2012. godine sa seroprevalencijom od 15,4% i 11,1% (Tablica 10.)

U Primorskoj Hrvatskoj zbog samo jedne pozitivne životinje u posljednje tri godine istraživanja te malog broja pretraženih životinja u kategorijama ždrijebadi i omadi te pastuha rezultati po godinama i kategorijama su teško usporedivi (Tablica 10.).

Statističkom analizom dobivenih rezultata na razini RH u cijelom razdoblju istraživanja potvrđeno je da kobile imaju statistički značajno veću vjerojatnost da će biti serološki pozitivne, a pastusi te ždrijebad i omad manju u odnosu na sveukupnu populaciju. Po godinama istraživanja ovo je dokazano za kobile u svakoj godini istraživanja te za pastuhe u svim godinama s izuzetkom 2010. i 2014. godine. Za razliku od toga u ždrijebadi i omadi nema statistički značajnih razlika vjerojatnosti za pozitivan nalaz na godišnjoj razini (Tablica 11.).

Značajnost rezultata određivana je i na regionalnoj razini, a iz analize je izostavljena Primorska Hrvatska zbog malog broja životinja. U Istočnoj Hrvatskoj dokazan je istovjetan trend kao i na području cijele RH sa značajno većom vjerojatnošću da će kobile biti serološki pozitivne kao i značajno manjom da će pozitivni biti pastusi te ždrijebad i omad. Ovaj trend u kobilama potvrđen je i u svakoj pojedinoj godini istraživanja dok su na godišnjoj razini pastusi značajno manju vjerojatnost seropozitiviteta u odnosu na sve pretražene životinje u toj godini imali 2011., 2012. i 2015. godine. U kategoriji ždrijebadi i omadi statistički manja vjerojatnost potvrđena je samo u 2013. godini (Tablica 11.).

Na regionalnoj razini, u Središnjoj Hrvatskoj u sveukupnom razdoblju istraživanja statistički je značajno veća vjerojatnost seropozitiviteta u kobilama, dok za ostale dvije kategorije kao niti za bilo koju kategoriju na godišnjoj razini ovo nije dokazano (Tablica 11.).

Uspoređujući Istočnu i Središnju Hrvatsku, sveukupno i na godišnjoj razini, uočeno je da je u cijelom istraživanom razdoblju statistički značajno veća vjerojatnost da će i pastusi i

kobile biti serološki pozitivni u Istočnoj Hrvatskoj u odnosu na Središnju Hrvatsku što nije dokazano za ždrijebad i omad. Na godišnjoj razini ovaj trend je podudaran za svaku godinu istraživanja uz izuzetak 2014. godine kada nisu dokazane razlike (Tablica 12.).

Uspoređujući rezultate na razini RH statistički je značajno veća vjerojatnost pozitivnog nalaza u pastuha u 2010. godini, prvoj godini istraživanja, a statistički značajno manja u posljednjoj godini obuhvaćenog istraživanjem (Tablica 13.). U kobila značajna odstupanja uočena su 2013. kada je vjerojatnost za seropozitivitet bila značajno veća, a sljedeće godine značajno manja, dok u ždrijebadi i omadi nije bilo značajnih razlika (Tablica 13.).

Na regionalnoj razini, u Istočnoj Hrvatskoj je u posljednjoj godini istraživanja, 2015., uočena značajno niža vjerojatnost za pozitivan serološki nalaz u pastuha. U kobila nakon značajno veće vrijednosti 2013. godine, dokazana je statistički značajno manja vjerojatnost u posljednje dvije godine obuhvaćene istraživanjem dok u ždrijebadi i omadi nije bilo značajnijih razlika (Tablica 13.). U Središnjoj Hrvatskoj jedine značajne razlike potvrđene su u pastuha sa značajno većim izgledima za serološki pozitivan nalaz 2010. te značajno nižim 2015. godine. Analiza rezultata u Primorskoj Hrvatskoj nije pokazala nikakve značajne razlike, a u Tablici 13. nije prikazana niti kasnije razmatrana zbog malog uzorka posebice u kategoriji ždrijebadi i omadi, te nepotvrđivanja pozitivnih životinja u pojedinim godinama (Tablica 10.).

Analizirajući korelaciju seroprevalencije na razini RH sa seroprevalencijom pojedinih kategorija u istraživanim regijama potvrđena je visoka korelacija seroprevalencije u RH i one u pastuha u Istočnoj Hrvatskoj ( $r=0,88$ ;  $CI_{95\%} 0,22-0,99$ ;  $p=0,02$ ). Ostale kategorije nisu imale značajnu korelaciju na razini cijele države niti regionalno.



**Tablica 10.** Seroprevalencija VAK prema kategoriji i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015.

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Kat	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)
Istočna Hrvatska	P	118/26	22,0	219/40	18,3	142/28	19,7	177/28	15,8	224/29	12,9	197/17	8,6	1077/168	15,6
	K	52/24	46,2	113/60	53,1	107/44	41,1	116/74	63,8	133/36	27,1	113/37	32,7	634/275	43,4
	Ž/O	1/0	0,0	6/0	0,0	11/1	9,1	33/5	15,2	9/0	0,0	23/0	0,0	83/6	7,2
<b>Ukupno</b>		171/50	29,2	338/100	29,6	260/73	28,1	326/107	32,8	366/65	17,8	333/54	16,2	1794/449	25,0
Središnja Hrvatska	P	105/12	12,9	232/10	4,3	251/7	2,8	323/16	5,0	265/26	9,8	239/7	2,9	1415/78	5,5
	K	46/3	6,5	80/10	12,5	43/5	11,6	17/2	11,8	37/6	16,2	31/2	6,5	254/28	11,0
	Ž/O	15/0	0,0	13/2	15,4	9/1	11,1	6/0	0,0	7/0	0,0	0/0	-	50/3	6,0
<b>Ukupno</b>		166/15	9,0	325/22	6,8	303/13	4,3	346/18	5,2	309/32	10,4	270/9	3,3	1719/109	6,3
Primorska Hrvatska	P	13/0	0,0	14/2	14,3	31/2	6,5	68/0	0,0	60/1	1,7	56/0	0,0	242/5	2,1
	K	10/4	40,0	9/3	33,3	12/2	16,7	1/0	0,0	2/0	0,0	4/0	0,0	38/9	23,7
	Ž/O	0/0	-	0/0	-	1/0	0,0	0/0	-	0/0	-	1/0	0,0	2/0	0,0
<b>Ukupno</b>		23/4	17,4	23/5	21,7	44/4	9,1	69/0	0,0	62/1	1,6	61/0	0,0	282/14	5,0
Republika Hrvatska	P	236/38	16,1	465/52	11,2	424/37	8,7	568/44	7,7	549/56	10,2	492/24	4,9	2734/251	9,2
	K	108/31	28,7	202/73	36,1	162/51	31,5	134/76	56,7	172/42	24,4	148/39	26,4	926/312	33,7
	Ž/O	16/0	0,0	19/2	10,5	21/2	9,5	39/5	12,8	16/0	0,0	24/0	0,0	135/9	6,7
<b>UKUPNO</b>		360/69	19,2	686/127	18,5	607/90	14,8	741/125	16,9	737/98	13,3	664/63	9,5	3795/572	15,1

Kat.–kategorija; N–broj uzoraka; P–broj pozitivnih; S (%)–seroprevalencija u postocima; P–pastusi; K–kobile; Ž/O–ždrijebad i omad

**Tablica 11.** Utjecaj kategorije na seroprevalenciju VAK u odnosu na ukupnu seroprevalenciju VAK u istoj regiji za svaku pojedinu godinu i ukupno

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Kat	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	P	0,68 0,4-1,18	0,17	0,53 0,35-0,81	<b>0,003</b>	0,63 0,38-1,03	0,07	0,38 0,24-0,61	<b>&lt;0,001</b>	0,69 0,43-1,11	0,12	0,49 0,27-0,87	<b>0,01</b>	0,55 0,46-0,67	<b>&lt;0,001</b>
	K	2,07 1,1-3,92	<b>0,02</b>	2,69 1,74-4,17	<b>&lt;0,001</b>	1,79 1,12-2,86	<b>0,02</b>	3,61 2,31-5,62	<b>&lt;0,001</b>	1,72 1,08-2,74	<b>0,02</b>	2,52 1,54-4,1	<b>&lt;0,001</b>	2,29 1,9-2,77	<b>&lt;0,001</b>
	Ž/O	0,8 0,03- 20,02	0,89	0,18 0,01-3,27	0,25	0,26 0,03-2,04	0,2	0,37 0,14-0,97	<b>0,04</b>	0,24 0,01-4,22	0,33	0,11 0,01-1,82	0,12	0,23 0,1-0,54	<b>&lt;0,001</b>
Središnja Hrvatska	P	1,3 0,58-2,9	0,52	0,62 0,29-1,34	0,22	0,64 0,25-1,63	0,35	0,95 0,48-1,9	0,88	0,94 0,55-1,63	0,83	0,88 0,32-2,39	0,79	0,86 0,64-1,16	0,33
	K	0,7 0,19-2,54	0,59	1,97 0,89-4,34	0,09	2,94 0,99-8,69	0,05	2,43 0,52-11,45	0,26	1,68 0,65-4,32	0,29	2 0,41-9,71	0,39	1,83 1,18-2,84	<b>0,007</b>
	Ž/O	0,32 0,02-5,53	0,43	2,5 0,52-12	0,25	2,79 0,32-23,98	0,35	1,37 0,07-25,18	0,83	0,57 0,03-10,2	0,7	27,53* 0,52-1462,99	0,1	0,94 0,29-3,08	0,92
Republika Hrvatska	P	0,81 0,52-1,25	0,34	0,55 0,39-0,78	<b>&lt;0,001</b>	0,55 0,37-0,82	<b>0,004</b>	0,41 0,29-0,59	<b>&lt;0,001</b>	0,74 0,52-1,05	0,09	0,49 0,3-0,79	<b>0,004</b>	0,57 0,49-0,67	<b>&lt;0,001</b>
	K	1,7 1,04-2,78	<b>0,04</b>	2,49 1,76-3,52	<b>&lt;0,001</b>	2,64 1,77-3,94	<b>&lt;0,001</b>	6,46 4,36-9,56	<b>&lt;0,001</b>	2,11 1,4-3,17	<b>&lt;0,001</b>	3,41 2,18-5,34	<b>&lt;0,001</b>	2,86 2,43-3,37	<b>&lt;0,001</b>
	Ž/O	0,13 0,01-2,14	0,15	0,52 0,12-2,27	0,38	0,6 0,14-2,64	0,5	0,72 0,28-1,89	0,51	0,2 0,01-3,31	0,26	0,19 0,01-3,22	0,25	0,4 0,2-0,8	<b>0,009</b>

Kat – kategorija; OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost, P – pastusi, K – kobile, Ž/O – ždrijebad i omad

**Tablica 12.** Omjer izgleda seropozitivnog nalaza u različitim kategorija u Istočnoj u odnosu na Središnju Hrvatsku za pojedinu godinu istraživanja i sveukupno

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Kat	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna u odnosu na Središnju Hrvatsku	P	2,19 1,04-4,6	<b>0,04</b>	4,96 2,41-10,2	<b>&lt;0,001</b>	8,56 3,63-20,18	<b>&lt;0,001</b>	3,61 1,89-6,87	<b>&lt;0,001</b>	1,37 0,78-2,4	0,28	3,13 1,27-7,71	<b>0,01</b>	3,17 2,39-4,2	<b>&lt;0,001</b>
	K	12,29 3,38-44,68	<b>&lt;0,001</b>	7,92 3,71-16,92	<b>&lt;0,001</b>	5,31 1,94- 14,56	<b>0,001</b>	13,21 2,88-60,62	<b>&lt;0,001</b>	1,92 0,74-4,98	0,18	7,06 1,6-31,19	<b>0,01</b>	6,18 4,05-9,44	<b>&lt;0,001</b>
	Ž/O	10,33 0,15-734,09	0,28	0,35 0,01-8,55	0,52	0,8 0,04-14,89	0,88	2,51 0,12-51,3	0,55	0,79 0,01-44,65	0,91	0,02 0,0002-2,63	0,12	1,12 0,27-4,69	0,88

Kat – kategorija; OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost, P – pastusi, K – kobile, Ž/O – ždrijebad i omad

**Tablica 13.** Omjer izgleda seropozitivnog nalaza za određenu kategoriju u pojedinoj godini u odnosu na cjelokupno razdoblje iste kategorije i regije

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.	
Regija	Kat	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	P	1,53 0,96-2,44	0,07	1,21 0,83-1,77	0,33	1,33 0,85-2,07	0,21	1,02 0,66-1,57	0,94	0,8 0,53-1,23	0,31	0,51 0,3-0,86	<b>0,01</b>
	K	1,12 0,63-1,97	0,7	1,48 0,99-2,21	0,06	0,91 0,6-1,38	0,66	2,3 1,53-3,47	<b>&lt;0,001</b>	0,48 0,32-0,73	<b>&lt;0,001</b>	0,64 0,42-0,97	<b>0,04</b>
	Ž/O	3,97 0,15-107,67	0,41	0,92 0,05-18,16	0,95	1,28 0,14-11,78	0,83	2,29 0,65-8,11	0,2	0,63 0,03-12,04	0,76	0,25 0,01-4,67	0,36
Središnja Hrvatska	P	2,21 1,16-4,21	<b>0,02</b>	0,77 0,39-1,51	0,45	0,49 0,22-1,08	0,08	0,89 0,51-1,55	0,69	1,86 1,17-2,97	<b>0,009</b>	0,52 0,24-1,13	0,1
	K	0,56 0,16-1,94	0,36	1,15 0,53-2,49	0,72	1,06 0,39-2,92	0,91	1,08 0,23-4,95	0,92	1,56 0,6-4,07	0,36	0,56 0,13-2,46	0,44
	Ž/O	0,44 0,02-8,95	0,59	2,85 0,42-19,16	0,28	1,96 0,18-21,25	0,58	1,04 0,05-22,59	0,98	0,9 0,04-19,33	0,95	13,57 0,23-792,75	0,21
Republika Hrvatska	P	1,9 1,31-2,75	<b>&lt;0,001</b>	1,25 0,91-1,71	0,17	0,95 0,66-1,36	0,76	0,83 0,59-1,16	0,28	1,12 0,83-1,53	0,45	0,51 0,33-0,78	<b>0,002</b>
	K	0,79 0,51-1,23	0,3	1,11 0,81-1,53	0,51	0,9 0,63-1,29	0,58	2,58 1,78-3,73	<b>&lt;0,001</b>	0,64 0,44-0,92	<b>0,02</b>	0,7 0,48-1,04	0,08
	Ž/O	0,4 0,02-7,26	0,54	1,65 0,33-8,27	0,54	1,47 0,3-7,35	0,64	2,06 0,65-6,55	0,22	0,4 0,02-7,26	0,54	0,27 0,02-4,82	0,37

Kat – kategorija; OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost, P – pastusi, K – kobile, Ž/O – ždrijebad i omad

## **5.6. Seroprevalencija VAK prema pasminama i regijama pretraženih životinja**

Od prikupljenih uzoraka konja, pasmina je bila jasno naznačena u popratnom obrascu za sveukupno 2403 životinje od kojih je 574 bilo pozitivnih što rezultira seroprevalencijom od 23,9% u cijelom istraživanom razdoblju. Sve životinje za koje se iz podataka u popratnom obrascu nije pouzdano mogla odrediti pasmina izuzeti su iz prikaza ovog dijela rezultata i analize utjecaja pasmine na seroprevalenciju VAK. Temeljem prikupljenih podataka, a sukladno broju uzoraka i epizootiološkom značaju, sve pretražene životinje podijeljene su i prema pasmini razvrstane u tri skupine, toplokrvnjaci, hladnokrvnjaci i lipicanci. Lipicanska pasmina je izdvojena od ostalih toplokrvnih s obzirom na veličinu uzorka i značaj. Tijekom istraživanja pretraženo je 393 konja toplokrvnih pasmina bez lipicanske pasmine, 591 konja hladnokrvnih pasmina te najveći broj, 1419 životinja lipicanske pasmine. Najviša seroprevalencija je utvrđena u konja lipicanske pasmine i iznosila je 36,2%. Seroprevalencija u toplokrvnih konja u cijelom istraživanom razdoblju bila je 9,2%, a najniža u hladnokrvnih konja u kojih je iznosila 4,2% (Tablica 14.).

Uspoređujući rezultate po pojedinoj godini obuhvaćenoj istraživanjem seroprevalencija u konja lipicanske pasmine se kretala od 47,2% 2013. godine do najniže od 21,0% u posljednjoj godini obuhvaćenoj istraživanjem. U toplokrvnih konja najviša seroprevalencija od 14,1% potvrđena je 2012. godine, a najniža od 3,8% 2014. godine. U hladnokrvnjaka najviša seroprevalencija je zabilježena 2011. godine (6,5%), a najniža od 1,0% tijekom 2015. godine, posljednje godine obuhvaćene istraživanjem (Tablica 14.).

U Istočnoj Hrvatskoj pasmina je bila jednoznačno istaknuta za 1580 životinja. Seroprevalencija u ovoj regiji u analiziranom uzorku je bila 32,7%, a najviša zabilježena u konja lipicanske pasmine (36,3%) nakon čega slijede toplokrvnjaci (11,7%). Najniža je bila u konja hladnokrvnih pasmina (3,1%). Slično se uočava i na godišnjoj razini jer je svake godine najviša seroprevalencija bila u konja lipicanske pasmine, a u godinama kada su pretraživani konji iz sve tri skupine uvijek je seroprevalencija u toplokrvnih konja bila viša od one u hladnokrvnih (Tablica 14.).

U Središnjoj Hrvatskoj je pasminski sastav uzorka značajno drugačiji. U istraživanom razdoblju je sveukupno analizirano 686 životinja od čega najveći broj konja hladnokrvnih pasmina (434), zatim toplokrvnih (215), a najmanji broj konja lipicanske pasmine (37). Seroprevalencija je bila najveća u konja lipicanske pasmine (32,4%), zatim toplokrvnjaka (8,4%) te najniža u konja hladnokrvnih pasmina (4,8%). Na godišnjoj razini najviše i najniže seroprevalencije prema pasminama su se razlikovale od vrijednosti za cijelo istraživano razdoblje (Tablica 14.).

U Primorskoj Hrvatskoj pasmine su bile naznačene za 137 životinja od kojih je 7 bilo pozitivno što daje seroprevalenciju od 5,1%. konja. Prema pasminama seroprevalencija u toplokrvnih konja je bila 8,0%, hladnokrvnih 1,7%, a dva pretražena konja lipicanske pasmine su bila negativna (Tablica 14.).

Utjecaj pasmine na seroprevalenciju analiziran je na razini RH i regije. Rezultati su prikazani u Tablici 15. s izuzetkom Primorske Hrvatske koja je izostavljena zbog malog uzorka.

Na razini RH, u cjelokupnom istraživanom razdoblju, statistički značajno viša seroprevalencija je potvrđena u konja lipicanske pasmine te značajno niža u konja

toplokrvnih i hladnokrvnih pasmina. S izuzetkom 2012. godine, ovakva značajnost razlika je potvrđena i u svakoj pojedinačnoj godini (Tablica 15.).

Slično je i u Istočnoj Hrvatskoj gdje je za cijelo istraživano razdoblje seroprevalencija u konja lipicanske pasmine statistički značajno viša, a konja ostalih pasmina značajno niža od ukupne. Analizirajući rezultate po godinama razlike su statistički značajne u 2010. godini nakon čega više nema značajnosti razlike seroprevalencije konja lipicanske pasmine u odnosu na opću u ovoj regiji. Statistički značajno niže vrijednosti u konja toplokrvnih i hladnokrvnih pasmina zabilježene su tijekom 2010., 2011. te 2013. godine (Tablica 15.).

U Središnjoj Hrvatskoj statistički značajno viša seroprevalencija ustanovljena je u konja lipicanske pasmine tijekom 2010., 2014. i 2015. godine dok ostale vrijednosti godišnjih seroprevalencija po pasminama nisu značajno odstupale od ukupne godišnje seroprevalenciji u ovoj regiji (Tablica 15.).

Uz analizu seroprevalencije u konja lipicanske pasmine analizirana je i razlika seroprevalencija VAK u toplokrvnih konja (koji nisu lipicanci) u odnosu na hladnokrvne pasmine. Rezultati su pokazali da su konji toplokrvnih pasmina, promatrajući cjelokupno razdoblje, imali statistički značajno veću vjerojatnost pozitivnog nalaza na razini RH i u Istočnoj Hrvatskoj u odnosu na hladnokrvne. Na području cijele RH, u istraživanom razdoblju, konji toplokrvnih pasmina imali 2,28 puta veći izgled za pozitivan nalaz (n=984, OR 2,28, 95% CI 1,35-3,87, p=0,002). U Istočnoj Hrvatskoj ovo je bilo još izraženije te su toplokrvni konji u odnosu na hladnokrvne imali 4,13 puta veću vjerojatnost pozitivnog nalaza (n=200, OR 4,13, 95% CI 1,13-15,12, p=0,03).

**Tablica 14.** Seroprevalencija VAK prema pasminama i regijama pretraženih životinja

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Pasm	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)	N/P	S (%)
Istočna Hrvatska	T	12/1	8,3	19/2	10,5	22/6	27,3	15/2	13,3	11/0	0,0	24/1	4,2	103/12	11,7
	H	9/0	0,0	32/2	6,3	12/0	0,0	20/1	5,0	13/0	0,0	11/0	0,0	97/3	3,1
	L	181/78	43,1	312/121	38,8	159/63	39,6	227/109	48,0	288/85	29,5	213/45	21,1	1380/501	36,3
<b>Ukupno</b>		202/79	39,1	363/125	34,4	193/69	35,8	262/112	42,7	312/85	27,2	248/46	18,5	1580/516	32,7
Središnja Hrvatska	T	15/3	20,0	30/2	6,7	51/5	9,8	45/4	8,9	33/2	6,1	41/2	4,9	215/18	8,4
	H	47/2	4,3	86/6	7,0	63/1	1,6	89/5	5,6	71/6	8,5	78/1	1,3	434/21	4,8
	L	10/6	60,0	1/0	0,0	3/0	0,0	6/1	16,7	8/3	37,5	9/2	22,2	37/12	32,4
<b>Ukupno</b>		72/11	15,3	117/8	6,8	117/6	5,1	140/10	7,1	112/11	9,8	128/5	3,9	686/51	7,4
Primorska Hrvatska	T	2/0	0,0	16/4	25,0	19/2	10,5	19/0	0,0	9/0	0,0	10/0	0,0	75/6	8,0
	H	5/0	0,0	5/0	0,0	11/1	9,1	16/0	0,0	11/0	0,0	12/0	0,0	60/1	1,7
	L	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	2/0	0,0	2/0	0,0
<b>Ukupno</b>		7/0	0,0	21/4	19,0	30/3	10,0	35/0	0,0	20/0	0,0	24/0	0,0	137/7	5,1
Hrvatska UKUPNO	T	29/4	13,8	65/8	12,3	92/13	14,1	79/6	7,6	53/2	3,8	75/3	4,0	393/36	9,2
	H	61/2	3,3	123/8	6,5	86/2	2,3	125/6	4,8	95/6	6,3	101/1	1,0	591/25	4,2
	L	191/84	44,0	313/121	38,7	162/63	38,9	233/110	47,2	296/88	29,7	224/47	21,0	1419/513	36,2
<b>UKUPNO</b>		281/90	32,0	501/137	27,3	340/78	22,9	437/122	27,9	444/96	21,6	400/51	12,8	2403/574	23,9

Pasm–pasmina; N–broj uzoraka; P–broj pozitivnih; S (%)–seroprevalencija u postotcima; T–toplokrvne pasmine; H–hladnokrvne pasmine; L–lipicanska pasmina



**Tablica 15.** Utjecaj pasmine na seroprevalenciju VAK po godinama i tijekom cijelog razdoblja istraživanja u odnosu na cjelokupnu seroprevalenciju u istoj regiji

Godina		2010.		2011.		2012.		2013.		2014.		2015.		UKUPNO	
Regija	Pasm	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P	OR 95%CI	P
Istočna Hrvatska	T	0,14 0,02-1,12	<b>0,06</b>	0,22 0,05-0,99	<b>0,048</b>	0,67 0,25-1,8	0,43	0,21 0,05-0,93	<b>0,04</b>	0,12 0,01-1,98	0,14	0,19 0,03-1,45	0,11	0,27 0,15-0,5	<b>&lt;0,001</b>
	H	0,08 0,005-1,42	<b>0,09</b>	0,13 0,03-0,54	<b>0,005</b>	0,7 0,004-1,23	0,07	0,07 0,01-0,53	<b>0,01</b>	0,1 0,01-1,68	0,11	0,19 0,01-3,27	0,25	0,07 0,02-0,21	<b>&lt;0,001</b>
	L	1,18 0,78-1,77	<b>0,43</b>	1,21 0,88-1,65	0,24	1,18 0,76-1,82	0,46	1,24 0,87-1,77	0,24	1,12 0,78-1,6	0,54	1,18 0,74-1,86	0,49	1,18 1,01-1,37	<b>0,04</b>
Središnja Hrvatska	T	1,39 0,34-5,73	0,65	0,97 0,2-4,84	0,97	2,01 0,58-6,92	0,27	1,27 0,38-4,26	0,7	0,59 0,12-2,82	0,51	1,26 0,24-6,76	0,79	1,14 0,65-1,99	0,65
	H	0,25 0,05-1,17	0,08	1,02 0,34-3,06	0,97	0,3 0,04-2,54	0,27	0,77 0,26-2,34	0,65	0,85 0,3-2,4	0,76	0,32 0,04-2,79	0,3	0,63 0,38-1,07	0,09
	L	8,32 2,01-34,37	<b>0,003</b>	4,29 0,16-113,65	0,38	2,45 0,11-52,63	0,57	2,6 0,28-24,46	0,4	5,51 1,16-26,24	<b>0,03</b>	7,03 1,15-42,87	<b>0,03</b>	5,98 2,84-12,59	<b>&lt;0,001</b>
Hrvatska UKUPNO	T	0,34 0,11-1	<b>0,005</b>	0,37 0,17-0,8	<b>0,01</b>	0,55 0,29-1,05	0,07	0,21 0,09-0,5	<b>&lt;0,001</b>	0,14 0,03-0,59	<b>0,008</b>	0,29 0,09-0,94	<b>0,04</b>	0,32 0,23-0,46	<b>&lt;0,001</b>
	H	0,07 0,02-0,3	<b>&lt;0,001</b>	0,18 0,09-0,39	<b>&lt;0,001</b>	0,08 0,02-0,33	<b>&lt;0,001</b>	0,13 0,06-0,3	<b>&lt;0,001</b>	0,24 0,1-0,58	<b>0,001</b>	0,07 0,01-0,5	<b>0,008</b>	0,14 0,09-0,2	<b>&lt;0,001</b>
	L	1,67 1,14-2,44	<b>0,009</b>	1,67 1,24-2,26	<b>&lt;0,001</b>	2,14 1,43-3,2	<b>&lt;0,001</b>	2,31 1,66-3,22	<b>&lt;0,001</b>	1,53 1,1-2,15	<b>0,01</b>	1,82 1,18-2,81	<b>0,007</b>	1,8 1,56-2,01	<b>&lt;0,001</b>

Pasm – pasmina; OR – omjer vjerojatnosti, 95%CI – interval povjerenja s pouzdanošću od 95%, p – vjerojatnost, T–toplokrvne pasmine; H–hladnokrvne pasmine; L–lipicanska pasmina

## **5.7. Logistička regresija i utjecaj čimbenika rizika na seropozitivitet**

S obzirom na ustanovljenu korelaciju kategorije konja s dobi i spolom, te činjenice da regija kao čimbenik rizika nije bio značajan nakon što su uklonjeni svi konji s nepotpunim podacima, završni model logističke regresije uključivao je godinu promatranja, spol, dob i pasminu. Referentna kategorija za spol je bio muški s obzirom na epizootiološki veći značaj. Za dob referentna kategorija su bile životinje mlađe od pet godina s obzirom na najmanju vjerojatnost izloženosti infekciji te za pasminu toplokrvne pasmine osim lipicanaca jer su one prema seroprevalenciji između hladnokrvnih pasmina i lipicanske pasmine.

Logističkom regresijom utvrđeno je da se izgledi za pozitivan nalaz VN-testa statistički razlikuju između spolova ako su ostali čimbenici konstantni. Isto tako izgledi rezultata VN-testa statistički su povezani s dobi životinje, godinom promatranja i pasminom.

Životinje ženskog spola imaju 1,96 (95% CI 1,44-2,68) puta veće izgleda da će biti pozitivne u VN testu u odnosu na životinje muškog spola ( $p < 0,001$ ). S porastom dobi povećavaju se izgledi za pozitivan ishod VN-testa i to povećavaju se za 3,99 (95% CI 2,55-6,43) puta u konja dobi 5-10 godina u odnosu na konje dobi do pet godina ( $p < 0,001$ ), a 16,53 puta (95% CI 10,6-26,65) u konja dobi više od 10 godina u odnosu na konje dobi do pet godina ( $p < 0,001$ ). Konji lipicanske pasmine imaju 6,46 (95% CI 4,17-10,31) puta veće izgleda biti pozitivni u odnosu na ostale konje toplokrvnih pasmina, dok između toplokrvnjaka i hladnokrvnjaka nisu pronađene statistički značajne razlike ( $p = 0,57$ ). Što se godina promatranja tiče, u svakoj sljedećoj godini promatranja izgled da će konj biti pozitivan iznosi 0,77 puta (95% CI 0,7-0,84) vrijednosti prethodne godine ( $p < 0,001$ ).

**Tablica 16.** Statistička analiza određenih epizootioloških značajki na seropozitivnost logističkom regresijom

Čimbenik rizika	OR	95%CI	p
<b>Godina</b>	0,77	0,7-0,84	<0,001
<b>Spol Ž</b>	1,96	1,44-2,68	<0,001
<b>Dob 5-10</b>	3,99	2,55-6,43	<0,001
<b>Dob &gt;10</b>	16,53	10,6-26,65	<0,001
<b>Pasmina HH</b>	0,83	0,42-1,57	0,57
<b>Pasmina LIP</b>	6,46	4,17-10,31	<0,001

Analizom relativne važnosti pojedinog čimbenika rizika u modelu logističke regresije, utvrđeno je da je na pozitivan ishod VN testa godina promatranja imala 6,74% utjecaja, spol životinje 14,73%, pasmina 28,95%, a najveći dob životinje s relativnom važnošću od 49,58%.

## **5.8. Analiza opsega provođenja mjera nadziranja i suzbijanja VAK na području RH u promatranom razdoblju**

Za procjenu opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH uspoređen je očekivani broj pretraživanja konja sa stvarnim brojem pretraženih životinja. Broj pobačaja i posljedično očekivanih potrebnih pretraga kobila izračunat je na osnovu broja kobila u pojedinoj godini te uobičajene razine koncepcije od 80% uz 4,5% očekivanih pobačaja. Što se tiče očekivanog postotka koncepcije u idealnim uvjetima koji uključuju optimalne uvjete držanja, visoku razinu profesionalne brige za rasplodne pastuhe i kobile i selekciju s obzirom na ranije korištenje u rasplodu, očekivani postotak koncepcije jako varira i iznosi 68%-95% (AMANN, 2006.; PRVANOVIĆ i sur. 2008.). Za potrebe ovoga istraživanja uzet je postotak koncepcije od 80%.

Kako u RH serološko pretraživanje obuhvaća sve necijepljene pastuhe te kobile u slučaju pobačaja očekivani broj pretraženih konja tijekom 2013. godine bio je 3434. On je obuhvaćao 3035 pastuha navedenih u Godišnjem izvješću o konjogojstvu, te koncepciju od 80% uz očekivani postotak pobačaja od 4,5% za 11088 kobila što iznosi 399. Ovo istraživanje je pokazalo da je 2013. godine pretraženo 833 životinja tako da su mjere nadzora i suzbijanja provedene na razini od 24,3%. Tijekom 2014. godine opseg provođenja mjera procijenjen na isti način je bio nešto viši, 27,1% da bi 2015. godine bio najniži od ove tri godine i iznosio 18,8% (Tablica 17.).

**Tablica 17.** Procjena opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH u razdoblju od 2013. do 2015. godine temeljem broj pastuha i kobila

<b>Godina</b>	<b>Broj pastuha</b>	<b>Broj kobila</b>	<b>Očekivani broj pobačaja</b>	<b>Očekivani broj pretraženih konja</b>	<b>Pretraženo konja</b>	<b>Opseg provođenja mjera (%)</b>
2013.	3035	8870	399	3434	833	24,3
2014.	2735	8542	384	3119	846	27,1
2015.	3331	9105	410	3741	702	18,8

Druga procjena opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH načinjena je u odnosu na broj registriranih rasplodnih pastuha i rasplodnih kobila te je i ovakvom usporedbom uočljivo da mjera nije provedena u cijelosti. Tako je 2013. godine provedena u opsegu od 89,3%, 2014. u opsegu od 97,9%, a 2015. godine samo u 63,5% (Tablica 18.).

**Tablica 18.** Procjena opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH u razdoblju od 2013. do 2015. godine temeljem broj registriranih rasplodnih pastuha i kobila

<b>Godina</b>	<b>Broj pastuha</b>	<b>Broj kobila</b>	<b>Očekivani broj pobačaja</b>	<b>Očekivani broj pretraženih konja</b>	<b>Pretraženo konja</b>	<b>Opseg provođenja mjera (%)</b>
2013.	673	5770	260	933	833	89,3
2014.	621	5393	243	864	846	97,9
2015.	863	5370	242	1105	702	63,5

### 5.8.1. Navođenje epizootioloških značajki o pretraživanim životinjama na popratnim obrascima uz dostavljene uzorke

Analizirani su dostupni podaci iz popratnih obrazaca koje su ovlaštene veterinarske organizacije dostavljale uz uzorke seruma za pretraživanje na VAK. Prema ovim podacima vidljivo je da se na najmanjem broju popratnih obrazaca naznačava pasmina konja (54,1%), zatim dob (57,8%) dok se u nešto većem postotku na dopisima označava kategorija (85,4%) i spol životinje (86,1%) (Tablica 19.).

Na regionalnoj razini dob se navodi na manje od 50% popratnih dopisa iz Primorske Hrvatske, a nešto više u ostatku države. Spol i kategorija se najrjeđe navode u Istočnoj Hrvatskoj, a pasmina je jednoznačno navedena samo u 37,5% konja čiji su uzorci upućeni na pretraživanje s područja Središnje Hrvatske (Tablica 19.).

**Tablica 19.** Broj popratnih obrazaca zaprimljenih uz uzorke seruma za serološku pretragu na VAK s jednoznačno naznačenom pojedinom značajkom životinje

Regija	Broj uzoraka	Podaci jednoznačno navedeni na popratnim obrascima			
		Dob (%)	Spol (%)	Kategorija (%)	Pasmina (%)
Istočna Hrvatska	2296	1340 (58,4)	1829 (79,7)	1794 (78,1)	1580 (68,8)
Središnja Hrvatska	1829	1075 (58,8)	1678 (91,7)	1719 (94,0)	686 (37,5)
Primorska Hrvatska	320	153 (47,8)	301 (94,1)	282 (88,1)	137 (42,8)
<b>Republika Hrvatska</b>	<b>4445</b>	<b>2568 (57,8)</b>	<b>3828 (86,1)</b>	<b>3795 (85,4)</b>	<b>2403 (54,1)</b>

## **5.9. Rezultati serološkog pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK**

### **5.9.1. Pretraživanje arhivskih uzoraka seruma VN-testom**

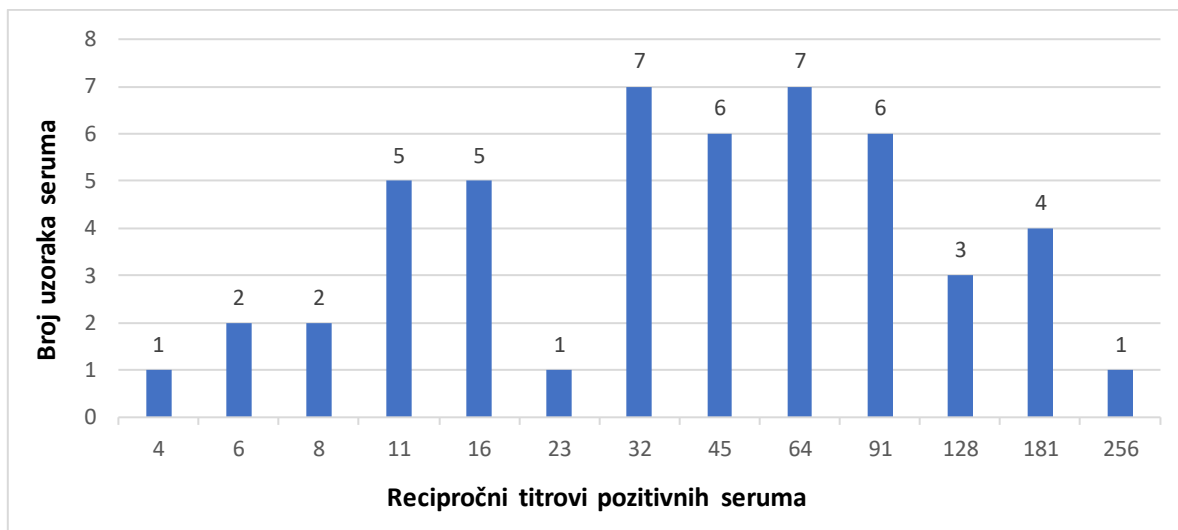
Metodom VN-testa pretraženo je 94 uzorka seruma konja odabrana iz arhive seruma laboratorija ARTER.lab. Pri odabiru uzeto je 50 uzoraka seruma koji su prethodnim pretraživanjem bili pozitivni na neutralizacijska protutijela za VAK te 44 s negativnim nalazom u prethodnom pretraživanju.

Koristeći VN-test ponovno su pretraživani ranije pozitivnih seruma te su dobiveni pozitivni rezultati za svih 50 ranije pozitivnih, a 44 ranije negativna seruma provedenim pretraživanjem potvrđena su kao negativni (titar protutijela < 1:4).

Titrovi odabranih arhivskih pozitivnih seruma određeni serološkom pretragom VN-testom, načinjenom neposredno prije pretraživanja komercijalnim imunoenzimnim testovima, kretali su se u rasponu od 1:4 do 1:256 (Slika 19.).

Rezultati pretraživanja VN-testom za pojedinačne serume prikazani su u Tablici 18. i Tablici 19.





**Slika 19.** Grafički prikaz broja uzoraka i titrova neutralizirajućih protutijela u pozitivnim arhivskim serumima konja određeni VN-testom

#### **5.9.2. Rezultati pretraživanja arhivskih uzoraka seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testom ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect**

Pretraživanjem 94 arhivska uzorka seruma komercijalnim imunoenzimnim testom ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect ustanovljeno je da je od 50 uzoraka pozitivnih VN-testom 41 bio pozitivan. Sedam uzoraka seruma pozitivnih VN-testom bila su negativna korištenjem ove komercijalne ELISA-e. Serumi s negativnim rezultatom pretraživanja imali su titrove neutralizacijskih protutijela u rasponu od 1:6 do 1:16. Tri su imala titar 1:11, dva 1:8 te po jedan 1:16 i 1:6 (Tablica 18.). Dva seruma u kojima je pretraživanjem ELISA testom rezultat bio sumnjiv (rezultati 56,57% i 51,67%) imali su titrove pretraživanjem VN-testom 1:16 i 1:4 (Tablica 18.).

Svih 44 arhivskih seruma koji su VN-testom bili negativni (titar < 1:4) bili su negativni i pretraživanjem komercijalnom ELISA-om ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (Tablica 19.).

Valjanost načinjene pretrage potvrđena je na način da je srednja vrijednost pretraživanja negativnog kontrolnog seruma bila 0,117 na jednoj, odnosno 0,093 na drugoj ploči. Srednja vrijednost pretraživanja pozitivnog kontrolnog seruma bila je 1,674 na prvoj, a 0,674 na drugoj korištenoj plitici. Temeljem navedenog zadovoljen je kriterij zadan od proizvođača ELISA kompleta za obje korištene mikrotitracijske plitice. Navedeni kriterij je bio da vrijednost za pozitivni kontrolni serum mora biti > 0,350, a omjer rezultata pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma > 3.

**Tablica 20.** Usporedba rezultata VN-testa i komercijalnih ELISA testova za serume konja s pozitivnim nalazom VN-testa

VN-test (titar)	ELISA				VN-test (titar)	ELISA			
	ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect		Ingezim Arteritis 2.0			ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect		Ingezim Arteritis 2.0	
	S/P%	Rezultat	$\Delta$ OD	Rezultat		S/P%	Rezultat	$\Delta$ OD	Rezultat
45	141,35	P	2,100	P	91	126,06	P	0,763	P
6	-9,95	N	0,212	P	16	108,24	P	0,401	P
11	0,00	N	0,288	P	45	281,37	P	1,411	P
64	67,71	P	1,947	P	8	3,12	N	0,365	P
91	77,21	P	0,964	P	64	308,98	P	0,790	P
16	56,57	S	0,277	P	11	21,53	N	0,535	P
11	21,83	N	0,636	P	128	220,34	P	1,360	P
64	281,81	P	1,661	P	64	185,30	P	0,709	P
128	381,14	P	1,254	P	181	203,41	P	1,482	P
23	99,33	P	0,885	P	16	207,87	P	0,476	P
256	256,12	P	1,964	P	32	162,14	P	0,637	P
32	259,09	P	0,501	P	11	79,58	P	0,533	P
181	265,03	P	2,773	P	32	125,61	P	1,534	P
91	189,76	P	1,712	P	181	312,25	P	2,245	P
45	264,44	P	0,756	P	64	233,70	P	1,373	P
181	330,81	P	1,500	P	64	213,96	P	1,491	P
45	283,44	P	0,749	P	8	18,11	N	0,320	P
16	13,81	N	0,550	P	6	62,36	P	0,972	P
91	409,80	P	1,755	P	32	145,36	P	0,739	P
16	65,48	P	0,346	P	32	173,27	P	0,499	P
91	206,68	P	0,627	P	32	148,33	P	0,582	P
91	506,90	P	2,413	P	4	51,67	S	0,188	P
45	437,27	P	0,491	P	128	60,13	P	1,608	P
64	274,24	P	0,767	P	45	205,20	P	0,954	P
11	67,26	P	0,461	P	32	193,76	P	0,736	P

S/P% - izračunata vrijednost očitavanja ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect testom,  $\Delta$ OD – izračunata korigirana vrijednost optičke gustoće očitavanja Ingezim Arteritis 2.0 testom, P – pozitivno, N – negativno, S – sumnjivo

**Tablica 21.** Usporedba rezultata VN-testa i komercijalnih ELISA testova za serume konja s negativnim nalazom VN-testa

VN- test (titar)	ELISA					VN- test (titar)	ELISA				
	ID Screen® S/P%	Equine Viral Arteritis Indirect		Ingezim Arteritis 2.0			ID Screen® S/P%	Equine Viral Arteritis Indirect		Ingezim Arteritis 2.0	
		Rezultat	ΔOD	Rezultat	Rezultat			ΔOD	Rezultat		
<1:4	47,33	N	0,023	N	<1:4	3,76	N	0,047	N		
<1:4	11,11	N	0,040	N	<1:4	6,63	N	0,023	N		
<1:4	4,96	N	0,337	<b>P</b>	<1:4	17,27	N	0,006	N		
<1:4	23,18	N	0,029	N	<1:4	14,70	N	0,007	N		
<1:4	16,73	N	0,070	N	<1:4	7,47	N	0,073	N		
<1:4	28,86	N	0,028	N	<1:4	16,07	N	0,114	<b>S</b>		
<1:4	15,66	N	0,086	N	<1:4	24,68	N	0,123	<b>S</b>		
<1:4	9,50	N	0,065	N	<1:4	24,74	N	0,005	N		
<1:4	21,51	N	0,084	N	<1:4	21,63	N	0,212	<b>P</b>		
<1:4	13,68	N	0,126	<b>S</b>	<1:4	29,94	N	0,043	N		
<1:4	20,32	N	0,030	N	<1:4	13,80	N	0,096	N		
<1:4	32,45	N	0,119	<b>S</b>	<1:4	34,00	N	0,093	N		
<1:4	22,89	N	0,293	<b>P</b>	<1:4	35,97	N	0,081	N		
<1:4	33,10	N	0,090	N	<1:4	25,10	N	0,040	N		
<1:4	46,55	N	0,020	N	<1:4	31,07	N	0,072	N		
<1:4	25,93	N	0,085	N	<1:4	31,49	N	0,052	N		
<1:4	13,98	N	0,059	N	<1:4	48,28	N	0,010	N		
<1:4	43,80	N	0,197	<b>P</b>	<1:4	8,31	N	0,131	<b>S</b>		
<1:4	34,18	N	0,144	<b>S</b>	<1:4	32,15	N	0,036	N		
<1:4	25,75	N	0,038	N	<1:4	38,60	N	0,140	<b>S</b>		
<1:4	21,39	N	0,001	N	<1:4	9,74	N	0,027	N		
<1:4	22,11	N	0,062	N	<1:4	25,40	N	0,035	N		

S/P% - izračunata vrijednost očitavanja ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect testom, ΔOD – izračunata korigirana vrijednost optičke gustoće očitavanja Ingezim Arteritis 2.0 testom, P – pozitivno, N – negativno, S – sumnjivo

### **5.9.3. Rezultati pretraživanja arhivskih uzoraka seruma konja komercijalnim imunoenzimnim testom Ingezim Arteritis 2.0**

Pretraživanjem ista 94 arhivska uzorka seruma komercijalnim imunoenzimnim testom Ingezim Arteritis 2.0 ustanovljeno je da je od 50 uzoraka pozitivnih VN-testom svih 50 bilo pozitivno i korištenjem ove metode (Tablica 20.).

Međutim od 44 uzorka seruma negativna VN-testom (titar <1:4) pretraživanjem komercijalnim imunoenzimnim testom Ingezim Arteritis 2.0 potvrđeno je kao negativno 33 uzorka dok su četiri uzorka seruma korištenjem ove metode bila pozitivna, a sedam ih je imalo sumnjiv rezultat. Vrijednost rezultata korigirane očitane optičke gustoće ova četiri pozitivna uzorka bila je između 0,197 i 0,337. Vrijednosti korigirane optičke gustoće za sedam sumnjivih uzoraka bila je između 0,114 i 0,144 (Tablica 21.).

Valjanost rezultata pretrage potvrđena je na način da je za pozitivan kontrolni serum srednja vrijednost optičke gustoće u jažici s antigenom umanjena za srednju vrijednost očitane u jažici bez antigena iznosila 1,655 na jednoj ploči te 1,298 na drugoj. Za negativan kontrolni serum srednja vrijednost optičke gustoće očitana u jažicama s dodanim antigenom umanjena za srednju vrijednost u jažicama bez u proizvodnji dodanog antigena bila je za prvu ploču 0,006, a za drugu 0,017. Navedeni rezultati značajno su iznad kriterija proizvođača kompleta za pozitivni kontrolni serum koji mora biti iznad 0,5 kao i značajno ispod kriterija navedenog za očitavanje rezultata negativnog kontrolnog seruma koji mora biti manji od 0,1.

#### 5.9.4. Rezultati određivanja podudarnosti između korištenih testova za serološko pretraživanje na VAK arhivskih uzoraka seruma

Uspoređujući rezultate serološkog pretraživanja arhivskih uzoraka seruma s tri navedene metode pokazana je jaka podudarnost između rezultata postignutih korištenjem VN-testa i komercijalnog ELISA testa ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect. Podudarnost između rezultata pretraživanja VN-testom i komercijalnim ELISA testom Ingezim Arteritis 2.0 bila je umjerena kao i međusobna podudarnost rezultata pretraživanja s dva komercijalna ELISA testa (Tablica 22.).

**Tablica 22.** Podudarnost rezultata serološkog pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK korištenjem različitih seroloških metoda

Usporedene metode	Podudarnost	Očekivana podudarnost	Kappa indeks	SE <sub>Kappa</sub>	Z	p
VN-test Ingezim Arteritis 2.0	88,30%	46,99%	<b>0,7792</b>	0,0908	8,58	<0,0001
VN-test ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect	90,43%	48,60%	<b>0,8137</b>	0,0985	8,26	<0,0001
Ingezim Arteritis 2.0 ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect	78,72%	44,26%	<b>0,6183</b>	0,0858	7,21	<0,0001

SE<sub>Kappa</sub> – standardna pogreška Kappa testa, Z – Z vrijednost, p - vjerojatnost

S obzirom da se VN-test smatra metodom izbora i „zlatnim standardom“ u dijagnostici VAK (OIE, 2018.), određivana je specifičnost i osjetljivost komercijalnih ELISA testova u odnosu na rezultate VN-testa uz uvažavanje seroprevalencije VAK na području RH ustanovljene u istraživanom razdoblju od 17,3% (Tablica 1.) te uz indeks povjerenja od 95% (CI 95%). Rezultati su prikazani u Tablici 23., a za određivanje rezultata uzorci sa sumnjivim rezultatima smatrani su pozitivni jer bi se u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici i oni kao i svi pozitivni morali dodatno pretražiti VN-testom (Tablica 20. i Tablica 21.).

**Tablica 23.** Osjetljivost, specifičnost i pouzdanost komercijalnih ELISA testova

<b>Značajka</b>	<b>ELISA test</b>			
	ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect		Ingezim Arteritis 2.0	
	Vrijednost	CI 95%	Vrijednost	CI 95%
<b>Osjetljivost</b>	86.00%	73.26% - 94.18%	100.00%	92.89% - 100.00%
<b>Specifičnost</b>	100.00%	91.96% - 100.00%	75.00%	59.66% - 86.81%
<b>Pouzdanost</b>	97.58%	92.08% - 99.64%	79.33%	69.74% - 86.99%

## **5.10. Arhivski uzorci RNK virusa VAK**

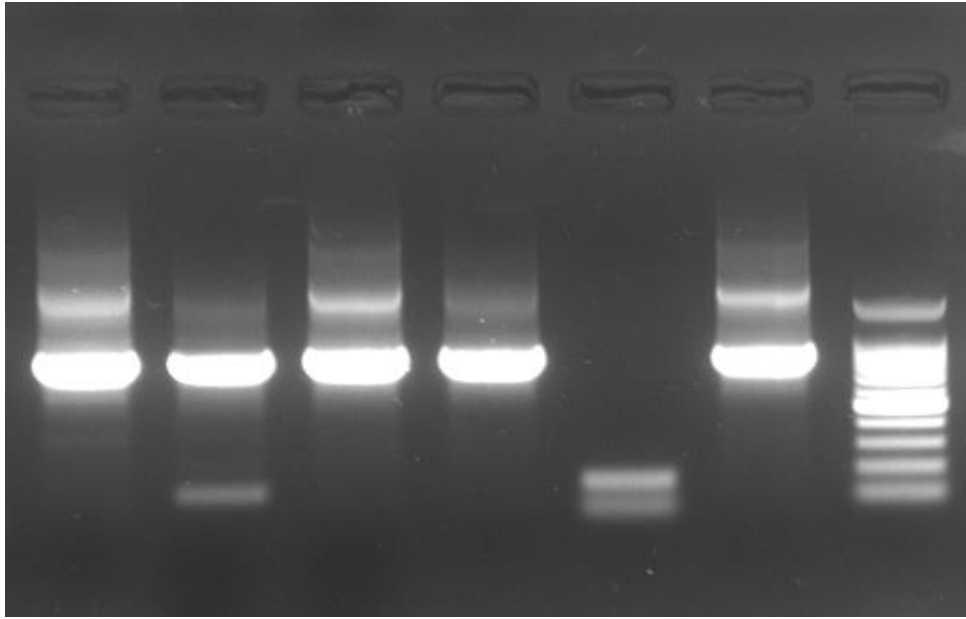
### **5.10.1. Lančana reakcija polimerazom za određivanje nukleotidnih sljedova ORF 5 gena EAV izdvojenih na području RH**

U svrhu molekularne tipizacije EAV izdvojenih na području RH korišteno je 25 arhiviranih RNK EAV izdvojenih iz uzoraka ejakulata pastuha serološki pozitivnih na virusni arteritis konja. Uspješno je umnožen ORF 5 gen u 16 uzoraka. Uspješnost umnažanja ciljnog odsječka genoma potvrđena je elektroforezom u gelu (Slika 20.) te je proizvod PCR reakcije poslan na određivanje nukleotidnog slijeda kako je opisano u poglavlju Materijali i metode.

Svih 16 EAV kojima je određen nukleotidni slijed ORF 5 gena izdvojeni su iz ejakulata pastuha lipicanske pasmine. Ukupno 14 uzoraka, s oznakama od 11 do 52 dobiveni su od pastuha s područja Osječko-baranjske županije te svi potječu od životinja iz istog uzgoja. Od navedenih 13 ih je izdvojeno tijekom 2010. godine, a jedan tri godine kasnije. Uzorci s oznakama 88 i 89 izdvojeni su iz ejakulata pastuha lipicanske pasmine tijekom 2013., odnosno 2014. godine. Ova dva pastuha su boravili u različitim selima Brodsko-posavske županije koja su međusobno udaljena manje od deset kilometara (Tablica 22.).

Uvidom u arhivirane nalaze serološkog pretraživanja VN-testom ustanovljeno je da su svi pastusi s uspješno umnoženim i određenim nukleotidnim slijedom ORF 5 gena imali titar neutralizirajućih protutijela određen VN-testom  $\geq 91$  (Tablica 22.).





**Slika 20.** Umnoženi odsječka nukleotidnog slijeda ORF 5 gena potvrđen elektroforezom u gelu

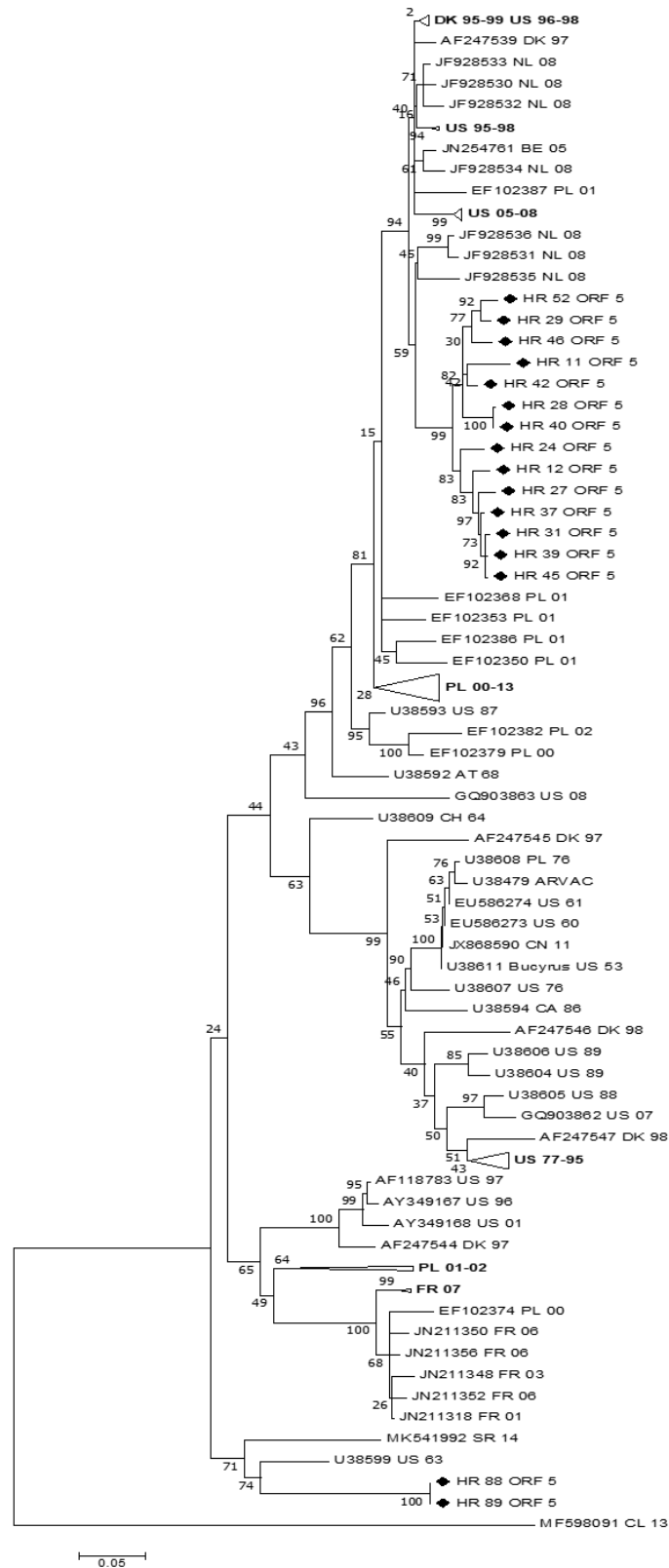
**Tablica 24.** Podaci o pastusima iz čijih uzoraka ejakulata je izdvojena i pohranjena RNK korištena u istraživanju.

<b>Oznaka arhivskog uzorka</b>	<b>Godina uzorkovanja</b>	<b>Pasmina</b>	<b>Titar neutralizirajućih protutijela (VN test)</b>	<b>Županija boravka pastuha</b>
11	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
12	2010.	Lipicanac	181	Osječko-baranjska
24	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
27	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
28	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
29	2010.	Lipicanac	128	Osječko-baranjska
31	2010.	Lipicanac	91	Osječko-baranjska
37	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
39	2010.	Lipicanac	>256	Osječko-baranjska
40	2010.	Lipicanac	256	Osječko-baranjska
42	2010.	Lipicanac	181	Osječko-baranjska
45	2010.	Lipicanac	128	Osječko-baranjska
46	2010.	Lipicanac	91	Osječko-baranjska
52	2013.	Lipicanac	181	Osječko-baranjska
88	2013.	Lipicanac	181	Brodsko-posavska
89	2014.	Lipicanac	256	Brodsko-posavska

### **5.10.2. Filogenetska analiza virusa VAK izdvojenih na području RH temeljem nukleotidnih sljedova ORF 5 gena**

Filogenetskom analizom umnoženih nukleotidnih sljedova ORF 5 gena dokazana je visoka srodnost EAV izdvojenih u uzgoju lipicanskih konja u Osječko-baranjskoj županiji tijekom 2010. godine kao i onog izdvojenog u istom uzgoju 2013. godine (uzorak 53). Ovi izolati virusa VAK najrodniji su s EAV izdvojenima u Nizozemskoj tijekom 2008. godine te su pripadnici europske skupine virusa VAK koji pripadaju u skupinu 1 (EU-1) (Slika 21.).

Za razliku od njih EAV dokazani na području Brodsko-posavske županije filogenetski su odvojeni od ranije navedenih, međusobno istovjetni te zajedno s EAV izdvojenim u SAD-u 1963. godine i EAV izdvojenim u Republici Srbiji 2014. godine čine zasebni ogranak u filogenetskom stablu (Slika 21.). Ovi virusi su korištenjem računalnog programa Blast najrodniji s pet izolata iz Mađarske (90,36 – 90,76% podudarnosti nukleotidnog slijeda ORF 5 gena) koji nisu korišteni u filogenetskoj analizi jer u banci gena nije navedena godina njihovog izdvajanja što je bio kriterij za odabir nukleotidnih sljedova za filogenetsku analizu.



**Slika 21.** Filogenetska analiza nukleotidnih slijedova ORF 5 gena EAV izdvojenih na području RH

## 6. RASPRAVA

Virusni arteritis konja je zbog raznolikog kliničkog očitovanja, specifične epizootiologije i zahtjevne dijagnostike te potencijala za uzrokovanje velikih gospodarskih gubitaka i ugrožavanja cjelokupnog uzgojnog programa jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti konja. Iz navedenih razloga VAK je prepoznat i od strane Svjetske organizacije za zdravlje životinja kao značajna bolest te su propisani standardi za minimalne mjere kontrole i prevenciju ove bolesti (OIE, 2018.; OIE 2021.), a koriste se na nacionalnoj razini i kod uvoza ili stavljanja u promet kopitara, sjemena i zametaka za embriotransfer.

U Republici Hrvatskoj, prisustvo uzročnika u populaciji konja prvi puta je opisano 2005. godine (BARBIĆ i sur., 2009.) te dodatno potvrđeno 2008. godine (osobna komunikacija). S nadziranjem i mjerama kontrole započinje se 2009. godine (ANONIMNO, 2009.b; ANONIMNO, 2009.c; ANONIMNO, 2009.f) te se iste godine donosi i Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja (ANONIMNO, 2009.e) koji je bez izmjena važeći i danas. Uvođenje propisanih mjera nadzora 2009. godine bio je razlog da se u planiranju ovog istraživanja obuhvati upravo razdoblje od 2009. do 2015. godine kako bi objektivno prosudili učinak uvođenja mjera u populaciji konja u kojoj se do tada bolest nije nadzirala. Međutim, u prvoj godini uvođenja nadzora, 2009. godini, dijagnostika se provodila na način da su svi uzorci seruma pretraživni imunoenzimnim testom (ELISA), a samo pozitivni uzorci su upućivani na pretraživanje VN-testom u referentni dijagnostički centar u Velikoj Britaniji. Kako je sve preostale godine dijagnostika provedena isključivo VN-testom, rezultati iz 2009. godine nisu usporedivi s preostalim godinama obuhvaćenim istraživanjem. Stoga su rezultati iz 2009. godine isključeni iz provedenih i prikazanih analiza kretanja seoprevalencije i određivanja

čimbenika rizika. Ipak, vrijedno je istaknuti da su tijekom 2009. godine pozitivne životinje dokazane na području Istočne Hrvatske (Osječko-baranjska, Vukovarsko-srijemska i Brodsko-posavska) te na području Zagrebačke županije. Ovakva geografska pojavnost pozitivnih životinja bila je u skladu s ranije spomenutim dokazom cirkulacije virusa na području Grada Zagreba 2005. i 2008. godine te Osječko-baranjske i Brodsko-posavske županije također 2008. godine (BARBIĆ i sur., 2009.; osobno priopćenje).

Praćenje kretanja seroprevalencije VAK i učinka mjera nadzora te određivanje čimbenika rizika analizirano je od 2010. godine u kojoj se uspostavlja jednoobrazan sustav nadzora pretraživanjem svih zaprimljenih uzoraka VN-testom koji se istovjetno provodio do kraja istraživnog razdoblja, 2015. godine.

Seroprevalencija je na razini cijele RH na početku istraživnog razdoblja, 2010. godine, iznosila 21,3%, a u cjelokupnom obuhvaćenom šestogodišnjem razdoblju 17,3%. S obzirom na proširenost EAV na europskom kontinentu, možemo reći da je to očekivana seroprevalencija, a čak možda i nešto niža s obzirom da MORAILLON i sur. (1978.) u svom radu prikazuju rezultate seroprevalencije VAK za Englesku od 14,2%, Portugal 22%, Francusku 15,2% i Austriju 58,6%, dok je seroprevalencija VAK za sve europske zemlje iznosila oko 28%, a za afričke oko 37%. Seroprevalencija utvrđena na početku promatranog razdoblja u RH, kao i u cjelokupnom razdoblju, također je niža od navedene u susjednoj Mađarskoj u kojoj su SZEREDI i sur. (2003) ustanovili relativno visoku seroprevalenciju VAK u rasponu od 27,8% do 62,8%, dok je u Bugarskoj ona iznosila čak 81,76% (CHENCHEV i sur., 2009.). Značajno viša seroprevalencija opisivana je primjerice i u Poljskoj gdje je iznosila 55,1% (ROLA i sur., 2011.), dok je u susjednoj Republici Srbiji bila nešto niža i iznosila 15,9% (LAZIĆ i sur., 2017.). Gotovo ista seroprevalencija kao u RH 2010. godine, utvrđena je u rasplodnih životinja u Španjolskoj

gdje je iznosila 21,1% (CRUZ-LOPEZ i sur., 2017.). Ovakve razlike u pojedinim državama su očekivane s obzirom da su u središtu epizootiologije bolesti pastusi kliconoše koji predstavljaju stalni izvor infekcije, najčešće tijekom koitusa, ali za koje je dokazana i uloga u horizontalnom širenju (GUTHRIE i sur., 2003.). Stoga značajne varijacije seroprevalencije ovise o načinu provođenja rasplodivanja i provođenju mjera nadzora VAK te prije svega prisustvu pastuha kliconoša u uzgoju na koje bi trebalo primarno i usmjeravati mjere nadzora.

Na području RH u istraživanom razdoblju, seroprevalencija se od 2010. godine do 2015. godini smanjila sa 21,3% na 9,7%. Analizom je ustanovljeno da je kroz navedeno razdoblje godina provođenja mjera bila značajna kao zaseban čimbenik te se svake godine statistički značajno umanjivala vjerojatnost za seropozitivan nalaz. Ovo potvrđuje da je uvođenjem mjera u istraživanom razdoblju doista postignut željeni učinak smanjenja seroprevalencije VAK na području RH.

Ovdje je posebno važno istaknuti da je ovakav učinak postignut čak i uz nepotpuno provođenje naređenih mjera koje su provedene, ukoliko bi obuhvaćali samo rasplodne životinje, u opsegu od 89,3% tijekom 2013. godine, 97,9% 2014. godine i samo 63,5% tijekom 2015. godine (Tablica 18.). Ukoliko se uzme u obzir nešto šira obveza pretraživanja svih pastuha te svih kobila u slučaju pobačaja, kako je i propisivano naredbama u istraživanom razdoblju, mjere su se u navedene tri godine provodile u opsegu od 24,3% 2013. godine, 27,1% 2014. i poražavajućih 18,8% tijekom 2015. godine (Tablica 17.). Razloge ovakvog neprovođenja mjere teško je shvatiti i zasigurno je u budućnosti potrebno intenzivirati edukaciju vlasnika konja, ali i veterinaru o ovoj bolesti. Potrebu za edukacijom veterinaru kao ključnih dionika u nadzoru i suzbijanju zaraznih bolesti generalno, pa i zaraznih bolesti konja, naglašava i činjenica da se na službenim

popratnim obrascima uz uzorke za laboratorijsko pretraživanje u velikom broju slučajeva ne navode osnovni podaci o životinjama koji su neophodni za analizu učinkovitosti i proaktivno usmjeravanje provedbe mjera (Tablica 19.).

Na regionalnoj razini Istočna Hrvatska je područje s najvišom seroprevalencijom kroz cijelo istraživano razdoblje te područje sa statistički značajnom korelacijom seroprevalencije s kretanjem seroprevalencije na području RH. Analizom rezultata dokazano je da se seroprevalencija i u ovom dijelu RH kroz razdoblje istraživanja značajno smanjila te je u posljednjoj godini istraživanja zabilježena najniža vrijednost (Tablica 4.) čime se potvrđuje uspješnost mjera i na regionalnoj razini.

Rezultati određivanja omjera vjerojatnosti za seropozitivnost kroz godine u regijama pokazali su u Istočnoj Hrvatskoj trend smanjenja kroz istraživano razdoblje. Iznimka je značajno povećanje 2013. godine što je moguća posljedica obuhvaćanja pretraživanjem druge skupine životinja, ali i neprijavljene epizootije na tom području (Tablica 4.). Slično odstupanje od općeg trenda smanjenja seroprevalencije zabilježeno je i u Središnjoj Hrvatskoj 2014. godine kada je vjerojatnost za seropozitivnost konja također značajno porasla (Tablica 4.). Ovakva odstupanja od generalnog trenda smanjenja seroprevalencije najvjerojatnije su rezultat nepotpunog i nekonzistentnog provođenja mjera nadzora spomenutog ranije. U takvim uvjetima, kada se ne izlučuju iz uzgoja pastusi kliconoše, može doći do povremenog horizontalnog širenja što su opisivali i drugi autori (GUTHRIE i sur., 2003.) te posljedičnog nastanka ograničenih epizootija.

U istraživanju je analiziran i utjecaj dobi na seropozitivnost. Naime, u istraživanjima drugih autora dokazano je da su infekcije značajno češće u starijih životinja u skupini rasplodnih konja, dok isto nije dokazano za sportske konja (CRUZ-LOPEZ i sur., 2017.).



Ovo naglašava da je dob značajan čimbenik rizika zbog same dulje izloženosti, ali i da je korištenje u rasplodivanju izrazito značajno u epizootologiji VAK. U ovom istraživanju dokazano je da je infekcija najučestalija u životinja u dobi iznad deset godina na području cijele RH kao i na regionalnoj razini s izuzetkom Primorske Hrvatske gdje je izostanak značajnosti vjerojatno posljedica malog uzorka (Tablica 6.). Navedeni trend je potvrđen za cijelo istraživano razdoblje, kao i svaku pojedinačnu godinu obuhvaćenu istraživanjem. Uzrok ovakvog rezultata je najvjerojatnije dulja izloženost životinja mogućim infekcijama kao i višekratno korištenje u rasplodu što je poznati čimbenik rizika za infekciju EAV zbog samih epizootioloških značajki bolesti. Viša seroprevalencija u starijih životinja dokazana je i u istraživanjima drugih autora (ROLA i sur., 2011.) uključujući i susjednu Republiku Srbiju s kojom Istočna Hrvatska dobrim dijelom dijeli zajedničke epizootiološke značajke (LAZIĆ i sur., 2017.).

Analizirajući vjerojatnost za seropozitivan nalaz u različitim regijama u odnosu na prosječnu seroprevalenciju iste dobne skupine na razini RH interesantno je zapažanje da je u Istočnoj Hrvatskoj, regiji s najvećom seroprevalencijom u RH, statistički značajno viša seroprevalencija bila u dobnoj skupini od pet do deset godina od 2011. do 2013. godine, a 2014. i 2015. godine značajno veća vjerojatnost seropozitiviteta zabilježena je u skupini životinja starijih od deset godina (Tablica 7.). Navedeno bi moglo biti rezultat uspješnog provođenja mjera kontrole u ovom dijelu RH i dugog poluživota neutralizirajućih protutijela. U tom slučaju bi seropozitivne životinje iz skupine od pet do deset godina u Istočnoj Hrvatskoj protekom vremena prešle u skupinu konja iznad deset godina, a zbog učinkovitosti mjera smanjila bi se učestalost infekcija te posljedično seroprevalencija u mlađih životinja. Ovu tvrdnju, na žalost ne možemo usporediti s istraživanjima drugih autora s obzirom da je, prema našem saznanju, ovo istraživanje prvo

u kojem se kretanja seroprevalencije EAV istražuje kroz dulje razdoblje na jednom geografskom području.

Analizirajući seroprevalenciju ovisno o spolu pretraženih životinja na području RH u obuhvaćenom razdoblju vjerojatnost za serološki pozitivan nalaz je bila 4,66 puta veća u ženskih u odnosu na muške životinje (Tablica 9.). Ovakav rezultat je u suprotnosti sa sličnim istraživanjem u Jordanu u kojem nije dokazana statistički značajna razlika seroprevalencije po spolu (TALAFHA i sur., 2016.). Navedeno istraživanje je načinjeno na značajno manjem uzorku korištenjem samo ELISA metode, a i epizootiološke značajke bolesti su vjerojatno različite. Rezultat našeg istraživanja je suprotan i od rezultata istraživanja u Poljskoj (SOCHA i sur., 2020.). Tada je seroprevalencija bila značajno viša u pastuha u odnosu na kobile, međutim i ovdje se radi o relativno malom uzorku, i vjerojatno različitim epizootiološkim značajkama. Razlog za višu seroprevalenciju u ženskih životinja u našem istraživanju mogao bi biti odvojeno držanje pastuha te zajedničko držanje kobila što je uobičajeno u uzgojima konja lipicanske pasmine u RH, pasmine za koju je u ovom istraživanju i dokazana najviša seroprevalencija kao i značaj logističkom regresijom (Tablica 15., Tablica 16.). Stoga u slučaju parenja kobila s pastuhom izlučivačem posljedično vjerojatno dolazi do horizontalnog širenja uzročnika na druge kobile s kojima boravi inficirana kobila, a odvojeno držani pastusi ostaju neinficirani.

Analizirajući utjecaj kategorije na seroprevalenciju životinje su podijeljene u pastuhe, kobile te zajedničku skupinu omadi i ždrebadi. Ponovo je potvrđeno da su kobile skupina s najvećim izgledom za seropozitivnost kako na regionalnoj tako i na razini cijele RH (Tablica 11.). Iz analize na regionalnoj razini isključena je Primorska Hrvatska zbog malog broja uzoraka u pojedinoj skupini, (samo dvije životinje u skupini omadi i ždrebadi

su pretražene u istraživanom razdoblju) (Tablica 10.). Seroprevalencija u cjelokupnom istraživanom razdoblju, u Istočnoj Hrvatskoj je značajno viša u kobilama, a značajno niža u pastuhama i ždrebadi i omadi. Na godišnjoj razini statistički je značajno viša svake godine za kobile, a značajno niža u tri godine za pastuhe, odnosno jednu za omad i ždrebad (Tablica 11.).

Za razliku od navedenoga u cjelokupnom razdoblju u Središnjoj Hrvatskoj je dokazana samo značajno viša seroprevalencija u kobilama. Analizirajući podatke za Središnju Hrvatsku na godišnjoj razini nema statistički značajnog odstupanja u pojedinoj kategoriji u odnosu na sveukupnu seroprevalenciju (Tablica 11.). Ovakve uočene razlike u Istočnoj i Središnjoj Hrvatskoj mogu se dovesti u vezu s različitom strukturom populacije konja u ovim dijelovima RH kao i razlika u načinu držanja. Tijekom istraživanog razdoblja, u Istočnoj Hrvatskoj dominantna pasmina su konji lipicanske pasmine, a u Središnjoj Hrvatskoj dominiraju konji pasmina hrvatski posavac i hrvatski hladnokrvnjak (POLJAK i sur., 2016.). Navedeno podrazumijeva i različit način držanja tako da se konji navedenih pasmina u Središnjoj Hrvatskoj drže ekstenzivno i poluekstenzivno (BARAĆ i sur., 2019.). Ekstenzivno držanje olakšava horizontalno širenje EAV na sve kategorije konja kroz stalni bliski kontakt. Za razliku od toga, u Istočnoj Hrvatskoj, uzgoj i rasplodivanje konja lipicanske pasmine provodi se planski. Kategorije konja se najčešće drže odvojeno što smanjuje mogućnost prijenosa među kategorijama. Analizirajući razlike u epizootiološkim značajkama uzgoja konja lipicanske pasmine te autohtonih hladnokrvnih pasmina možemo i istaknuti da se lipicanci drže u manjim skupinama. Prema službenim podacima za RH (BARAĆ i sur., 2019.) vlasnici lipicanaca u prosjeku imaju 2,9 životinja dok pojedinačni vlasnici hladnokrvnjaka drže u prosjeku više od dvostruko većeg broj životinja (6,4 konja po vlasniku). Ove rezultate ne možemo usporediti sa sličnim iz drugih

istraživanja jer, prema našim saznanjima, ovakva istraživanja u RH ili drugim državama do sada nisu provedena.

Uspoređujući podatke o kretanju seroprevalencije u istraživanom razdoblju po kategorijama u Istočnoj i Središnjoj Hrvatskoj (Tablica 12.), interesantno je da je u kategoriji pastuha i kobila seroprevalencija u Istočnoj Hrvatskoj u cjelokupnom obuhvaćenom razdoblju značajno viša što nije slučaj u ždrebadi i omadi. Ovakav rezultat sugerira učestalije zaražavanje životinja u Istočnoj Hrvatskoj nakon spolne zrelosti, najvjerojatnije tijekom rasplodivanja. Poznavajući epizootiološke prilike konjogojstva RH, ovaj rezultat donekle je u suprotnosti s ekstenzivnim rasplodivanjem i uzgojem konja u Središnjoj Hrvatskoj, koji bi trebao olakšati prijenos uzročnika, te planskim i kontroliranim uzgojem u konja dominantno lipicanske pasmine u Istočnoj Hrvatskoj. Navedeno sugerira učestalo korištenje u rasplodivanju lipicanaca pojedinih pastuha kliconoša, a što je moguće s obzirom na nepotpuno provođenje mjera nadzora i suzbijanja VAK.

Na godišnjoj razini statistički je značajno viša seroprevalencija u pastuha i kobila u Istočnoj Hrvatskoj u odnosu na Središnju Hrvatsku za sve godine osim tijekom 2014. godine (Tablica 12.). Ovo dodatno potvrđuje pretpostavku o pojavi epizootije VAK u Središnjoj Hrvatskoj tijekom te ili prethodne godine što je uočeno i u razmatranju seropozitivnosti kroz godine na regionalnoj razini (Tablica 4.).

Kretanje seroprevalencije u pojedinim kategorijama (Tablica 13.) u Istočnoj Hrvatskoj pokazuju značajno smanjenje seroprevalencije u pastuha tijekom 2015. godine. Ovo je indirektna potvrda učinkovitosti provedenih mjera čak i provedenih u ograničenom opsegu. U kobila je značajni porast seroprevalencije uočen jedino 2013. godine, koja bi

mogla biti posljedica horizontalnog širenja 2012. ili 2013. godine povezanog s korištenjem pastuha kliconoše. U Središnjoj Hrvatskoj nakon trenda opadanja, 2014. godine uočen je značajan porast seroprevalencije u pastuha. Kako smo ovu godinu istaknuli ranije kao godinu u kojoj se vjerojatno dogodila epizootija VAK u ovom dijelu RH, porast seroprevalencije u pastuha s izostankom u kobilu sugerira moguće horizontalno širenje u nekom uzgoju s većim brojem pastuha o čemu nemamo potrebne podatke za daljnju analizu i potvrdu ovakve tvrdnje. Ovakva mogućnost je opisana kod uvođenja novog pastuha u skupinu (OTZDORFF i sur., 2021.) što je možda i ovdje bio slučaj.

Pasminske razlike u seroprevalenciji VAK, uvjetovane različitim načinima uzgoja i korištenja životinja, kao i razlike prema geografskom podrijetlu životinja, opisivane su i u drugim istraživanjima (HULLINGER i sur., 2001). Na području RH dokazano je da su konji lipicanske pasmine značajno češće inficirani EAV u odnosu na konje toplokrvnih i hladnokrvnih pasmina. Toplokrvni konji (bez lipicanaca) su 2,28 puta češće bili pozitivni u odnosu na konje hladnokrvnih pasmina (Tablica 15.). Kako se parenje po pravilu radi unutar iste pasmine, ovakve razlike nisu neočekivane s obzirom da su u središtu epizootiologije bolesti pastusi kliconoše. Slični rezultati sa značajnim razlikama seroprevalencije ovisno o pasminama opisivani su i u drugim istraživanjima (TIMONEY i McCOLLUM, 1993.; NEWTON i sur., 1999.; BALASURIYA i sur., 2016.a).

Sveukupno, mogli bi zaključiti da je seroprevalencija od uvođenja mjera nadzora i suzbijanja VAK na području RH padala bez obzira na ograničeni opseg provođenja naređenih mjera. Najugroženija regija u RH je Istočna Hrvatska, a s višom dobi i korištenjem u rasplodu su životinje izloženije infekcijama. Kobile su značajno češće inficirane od pastuha ili ždrebadi i omadi. Odstupanja od generalnog kretanja

seroprevalencije zabilježena su u po jednoj godini u kobilama u Istočnoj Hrvatskoj te pastuha u Središnjoj Hrvatskoj. Ova odstupanja u kretanju seroprevalencije sugeriraju da usprkos mjerama kontrole povremeno dolazi do ograničenih epizootija. Seroprevalencija je značajno različita ovisno o pasminama konja. Najugroženiji su konji lipicanske pasmine iza čega slijede konji toplokrvnih pasmina, a najpovoljnija je epizootiološka situacija u konja hladnokrvnih pasmina. Postoji korelacija seroprevalencije na razini RH sa seroprevalencijom u Istočnoj Hrvatskoj, kao i seroprevalencijom u pastuha u ovoj regiji. Navedeno podcrtava upravo ove životinje kao ciljnu skupinu za intenzivniju provedbu mjera nadzora i suzbijanja VAK.

Logističkom regresijom potvrđeno je smanjenje seroprevalencije u svakoj sljedećoj godini, povećani rizik od infekcija u ženskih životinja, konja lipicanske pasmine kao i značaj porasta dobi pretraživanih životinja na seroprevalenciju. Rezultatima je potvrđeno da među navedenim, u povećanju rizika za infekciju, najveći utjecaj ima povećanje dobi životinje nakon toga pasmina, u manjoj mjeri spol, a najmanje godina provođenja istraživanja. Ovakav rezultat indirektno potvrđuje da epizootiološku situaciju VAK u RH obilježava stalna tiha cirkulaciju EAV u populaciji konja zbog čega je povećanje dobi najznačajniji čimbenik rizika za infekciju, a ova cirkulacija je očito naglašenija u konja lipicanske pasmine. U prilog ovakvoj cirkulaciji ide i značaj spola jer veća vjerojatnost infekcija u kobilama može se dovesti u vezu s lateralnim širenjem u uzgojima nakon rasplodivanja s pastusima kliconošama. Utjecaj godine istraživanja u smislu smanjenja izgleda za seropozitivan nalaz ipak ohrabruje jer se i djelomičnim provođenjem mjera očito postižu rezultati u nadzoru i suzbijanju ovog uzročnika u RH. Iz svega prikazanoga te u cilju sprječavanja pojave VAK u uzgojima u RH, odnosno iskorjenjivanja EAV na području RH, potrebno je značajno opsežnije nadziranje s primarnim fokusom na

pronalaženje i izlučivanje iz rasplodivanja pastuha kliconoša lipicasne pasmine, ali i pojačani nadzor u preostaloj populaciji konja s obzirom na dokazanu cirkulaciju i vjerojatne povremene epizootije bolesti u primjerice hladnokrvnih pasmina. Neprovođenje kontrole može uzrokovati nekontrolirano širenje u pojedinim uzgojima kao što je to opisivano u, primjerice, susjednoj Sloveniji (HOSTNIK i sur., 2011.) nakon čega nadzor i suzbijanje postaje gotovo nemoguće.

U dijagnostici VAK metoda izbora za serološko pretraživanje u svrhu potvrde statusa pojedine životinje je VN-test (OIE, 2018.). Osim nje, za potrebe određivanja seroprevalencije u nadzoru infekcija preporučenom se smatra i ELISA (OIE, 2018.). Štoviše, zbog ograničenja u dijagnostici VAK VN-testom koji su posljedica citotoksičnosti seruma životinja imuniziranih pojedinim cjepivima za rinopneumonitis konja (GERAGHTY i sur., 2003.; CULLINANE, 2004.; NEWTON i sur., 2004.) neki autori predlažu šire korištenje ELISA testova (LEGRAND i sur., 2009.). Iako su u pojedinim istraživanjima dokazane izrazito visoke specifičnosti i osjetljivosti komercijalnih ELISA testova (PFAHL i sur., 2016.), odnosno visoke osjetljivosti i varijabilne specifičnosti (BANNAI i sur., 2018.), potrebno je svaki test provjeriti u vlastitom laboratoriju (DUTHIE i sur., 2008.) i specifičnim epizootiološkim prilikama.

U ovom istraživanju načinili smo usporedbu rezultata pretraživanja komercijalno dostupnim ELISA testovima s rezultatima pretraživanja VN-testom kako bi objektivno ustanovili mogućnost korištenja ovih metoda u epizootiološkim prilikama RH. Rezultati su potvrdili jaku podudarnost između rezultata postignutih korištenjem VN-testa i komercijalnog ELISA testa ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect te umjerenu podudarnost između rezultata pretraživanja VN-testom i komercijalnim ELISA testom Ingezim Arteritis 2.0 (Tablica 22.). Pouzdanost testa ID Screen® Equine Viral Arteritis

Indirect je također bila viša. Zanimljivo je da je isti test imao 100% specifičnost i 86% osjetljivost dok je test ELISA testom Ingezim Arteritis 2.0 imao 75% specifičnost i 100% osjetljivost (Tablica 23.).

Navedeni rezultati jasno ukazuju na različit pristup proizvođača koji su određivanjem granične vrijednosti s jedne strane željeli podići specifičnost, odnosno drugi proizvođač osjetljivost svoga testa. Temeljem provedenog istraživanja korištenjem komercijalnog testa ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect svi VN-test negativni rezultati potvrđeni su kao negativni. Po drugoj strani, čak sedam VN-test pozitivnih seruma je bilo negativno, a dva granična (Tablica 20., Tablica 21.). Pretraživanjem komercijalnim ELISA testom Ingezim Arteritis 2.0 svih 50 pozitivnih seruma je bilo pozitivno, ali su četiri negativna seruma bila lažno pozitivna te ih je šest dodatnih bilo sumnjivo (Tablica 20., Tablica 21.). Razmatrajući dokazanu podudarnost rezultata i pouzdanost testa nedvojbeno su bolji rezultati postignuti korištenjem komercijalnog testa ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect te bi on bio bolji odabir u serološkoj dijagnostici VAK u RH. Međutim, analizirajući značaj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata preporuka o korištenju bi bila upravo suprotna. Naime korištenjem komercijalnog testa ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect postoji mogućnost previda pozitivne životinje. Iako je u istraživanju u kojem je serološki višekratno pretraživan pastuh kliconoša kroz razdoblje od sedam godina dokazano da mu titar neutralizirajućih protutijela nikada nije bio niži od 1:64 (ROLA i sur., 2013.), a lažno negativni serumi u ovom istraživanju su imali relativno nizak titar neutralizirajućih protutijela ( $\leq 16$ ), rizik previda pozitivnog pastuha kliconoše korištenjem ovog testa ipak se ne može isključiti. Nadalje, s obzirom na rezultate, korištenjem ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect testa ne smanjujemo zahtjeve za pretraživanjem svih uzoraka VN-testom ukoliko želimo imati pouzdane rezultate za



provedbu nadzora i suzbijanja bolesti jer ne možemo biti sigurni u negativne rezultate. S druge strane primjenom komercijalnog ELISA testa Ingezim Arteritis 2.0, prema rezultatima ovog istraživanja, mogli bismo biti sigurni da nema lažno negativnih rezultata pretraga te bi negativne serume mogli izostaviti iz pretraživanja VN-testom. Dodatnim pretraživanjem samo pozitivnih i sumnjivih seruma, dobili bi jednako pouzdan rezultat kao i da sve serume pretraživamo VN-testom, a ubrzali bi vrijeme pretraživanja te smanjili opterećenje laboratorija u izvedbi zahtjevne metode VN-testa.

Sve ove tvrdnje potrebno je dodatno istražiti jer nije moguće u potpunosti isključiti i mogućnost da su uzorci negativni VN-testom, a pozitivni ELISA-om doista pozitivni, ali zbog niže osjetljivosti VN-testa u odnosu na ELISA-u imamo ovakve razlike u rezultatima. Međutim, kako se VN-testom i dalje smatra zlatnim standardom za dijagnostiku VAK (OIE, 2018.), rezultati našeg istraživanja potvrdili su da se određeni komercijalno dostupni ELISA test može koristiti u dijagnostici VAK na području RH ali da svakako uzorci pozitivni ELISA testom moraju biti dodatno pretraženi i VN-testom.

U svrhu određivanja molekularne epizootiologije VAK na području RH u ovom istraživanju načinjena je molekularna tipizacija i filogenetska analiza 16 EAV dokazanih na području Istočne Hrvatske u razdoblju obuhvaćenom istraživanjem. Rezultati su potvrdili visoku srodnost 14 EAV dokazanih na području Osječko-baranjske županije u razdoblju od 2010. do 2013. godine. S obzirom da se radi o životinjama iz istog uzgoja njihove međusobne razlike ne predstavljaju dokaz višekratnog unošenja nego su u skladu s dokazanim mutacijama EAV koje se događaju tijekom vremena u pastuha kliconoša (ROLA i sur., 2013.; NAM i sur., 2019.). Uspoređujući ove izolate s izolatima iz drugih država, dokazano je da su najrodniji s EAV izdvojenima u Nizozemskoj tijekom 2008. godine koji su predstavnici EU-1 skupine (STEINBACH i sur., 2015.) te možemo

zaključiti da i ovih naših 14 izolata pripada istoj skupini. Interesantna je podudarnost da je u Osječko-Baranjskoj županiji prisustvo VAK prvi put dokazano upravo 2008. godine, iste godine kada su izdvojeni i ovi EAV sojevi u Nizozemskoj. Navedeno otvara pitanje je li možda upravo te godine ovaj soj virusa unesen na područje Osječko-baranjske županije međunarodnim prometom za potvrdu čega na žalost nemamo dostupne podatke.

Preostala dva izolata koja su dokazana u lipicanskih pastuha na području Brodsko-posavske županije su međusobno vrlo srodni, međutim potpuno filogenetski odvojeni od navedenih izolata s područja Osječko-baranjske županije. Ova dva virusa su filogenetski srodni EAV izdvojenom u Republici Srbiji tijekom istraživanja provedenog 2013. i 2014. godine (LAZIĆ i sur., 2017.), a najrodniji su s EAV izdvojenim u SAD-u 1963. te svi zajedno tvore potpuno odvojen ogranak na filogenetskom stablu (Slika 21.). Koliko god bio iznenađujući ovakav rezultat on je u skladu s istraživanjem objavljenim 2003. godine kada GUTHRIE i sur. (2003.) iznose rezultate filogenetske analize EAV izdvojenih iz perzistentno inficiranih pastuha u Južno Afričkoj Republici (JAR). Autori opisuju dokaz EAV u sjemenu perzistentno inficiranih pastuha koji je filogenetski najrodniji sa spomenutim virusom izdvojenim 1963. godine u SAD-u, a za kojeg smatraju da je unesen u JAR uvozom pastuha kliconoše iz tadašnje Jugoslavije s ergele Đakovo 1981. godine. Ovom pastuhu je tek 1988. godine dokazano kliconoštvo, a niti nakon toga nije izlučen nego je živio do 1993. godine u karanteni. Autori smatraju da je tijekom svog života upravo ovaj pastuh odgovoran za širenje EAV u lipicanaca u JAR. Opisujući izolat EAV iz Republike Srbije dokazan 2014. godine LAZIĆ i sur. (2017.) navode da je virus najrodniji s izolatima iz Mađarske koji nisu uzeti u filogenetsku analizu za ovo istraživanje jer nisu zadovoljavali kriterije odabira navedene u poglavlju Materijal i metode. Činjenice iz navedenih istraživanja i rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju da

na prostoru RH i država u okruženju cirkulira virus arteritisa konja koji ne prati globalna kretanja i širenje nego je očito prisutan na ovom prostoru preko 40 godina i predstavlja odvojeni ogranak evolucije što zahtjeva daljnja istraživanja.

Sveukupno dokaz s jedne strane prisustva EAV koji prate recentne epizootičke trendove pojave ovog uzročnika u Europi te istovremeno na istom području neovisne cirkulacije soja EAV prisutnog desetljećima naglašava značaj provođenja daljnjih istraživanja, ali i najizravnije dokazuje kontinuitet prisustva kronično inficiranih kliconoša na našem prostoru. Ovakva stalna tiha cirkulacija različitih sojeva virusa obvezuje na daljnje intenzivno provođenje mjera koje je temeljem rezultata ovog istraživanja potrebno usmjeriti prije svega na konje lipicanske pasmine u Istočnoj Hrvatskoj. Samo potpunim provođenjem mjera, koje su se dokazale učinkovitim, možemo nastaviti nadzirati i suzbijati EAV kako ne bi ugrozili konjogojstvo RH, a prije svega nacionalnu baštinu uzgoja lipicanaca.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Virusni arteritis konja je bio proširen u cijeloj Republici Hrvatskoj tijekom cijelog istraživanog razdoblja s najvećom učestalošću u Istočnoj Hrvatskoj.
2. Uvođenjem mjera nadzora i suzbijanja VAK seroprevalencija se značajno smanjila što potvrđuje učinkovitost i dobru usmjerenost propisanih mjera.
3. Propisane mjere se nisu provodile u zadovoljavajućem opsegu, a u samoj provedbi je bilo nedostataka što je umanjilo mogući veći pozitivan učinak.
4. Rizični čimbenici infekcije EAV su viša životna dob, a infekcije su češće u kobila i generalno konja lipicanske pasmine.
5. Epizootije bolesti se povremeno pojavljuju u Istočnoj i Središnjoj Hrvatskoj s različitim epizootiološkim značajkama uvjetovano pasminskom strukturom te načinom držanja i korištenja konja.
6. Serološku dijagnostiku na području RH u svrhu nadzora infekcije u populaciji moguće je provoditi ELISA testovima nakon validacije u lokalnim epizootiološkim prilikama.
7. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom dokazano je prisustvo najmanje dva soja virusa od kojih jedan prati globalne trendove, a drugi ima neovisnu evoluciju.
8. Dokazana cirkulacija različitih sojeva EAV uz istovremeno nepotpunu provedbu mjera nadziranja i suzbijanja VAK može predstavljati opasnost za konjogojstvo Republike Hrvatske zbog čega je nužno intenzivirati provedbu mjera uz dodatnu edukaciju vlasnika i veterinara o rizicima od ove bolesti.

## 8. POPIS LITERATURE

AMANN, R. P. (2006.): The fertility dilemma: perception versus actuality. *Equine Vet. Educ.* 18, 159-164.

ANONIMNO (1990.): Direktiva Vijeća 90/426/EEZ o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za premještanje i uvoz kopitara iz trećih zemalja.

ANONIMNO (1995.): Odluka Komisije 95/329/EZ od 25. srpnja 1995. o utvrđivanju kategorija mužjaka kopitara na koje se primjenjuje zahtjev u pogledu virusnog arteritisa propisan u članku 15. točki (b) alineji (ii) Direktive Vijeća 90/426/EEZ.

ANONIMNO (2004.): Pravilnik o načinu i postupku prijave sumnje na zaraznu bolest životinja, prijavi i odjavi zarazne bolesti životinja te obliku i sadržaju propisanih obrazaca. *Narodne novine* 179/04.

ANONIMNO (2008.): Pravilnik o veterinarskim uvjetima za premještanje kopitara i uvoz iz trećih zemalja. *Narodne novine* 154/08.

ANONIMNO (2009.a): Pravilnik o zahtjevu za određene kategorije muških grla kopitara u odnosu na arteritis konja, koji se primjenjuje prilikom premještanja i uvoza iz trećih zemalja. *Narodne novine* 101/09.

ANONIMNO (2009.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini. *Narodne novine* 151/08.

ANONIMNO (2009.c): Naredba o izmjeni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini. Narodne novine 100/09.

ANONIMNO (2009.d): Direktiva vijeća 2009/156/EZ od 30. studenoga 2009. o uvjetima zdravlja životinja kojima se uređuje premještanje i uvoz kopitara iz trećih zemalja.

ANONIMNO (2009.e): Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja. Narodne novine 62/09.

ANONIMNO (2009.f): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini. Narodne novine 2/09.

ANONIMNO (2009.g): Pravilnik o načinu prijave bolesti životinja. Narodne novine 31/09.

ANONIMNO (2009.h): Pravilnik o zahtjevu za određene kategorije muških grla kopitara u odnosu na arteritis konja, koji se primjenjuje prilikom premještanja i uvoza iz trećih zemalja, Narodne novine 101/09.

ANONIMNO (2010.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini. Narodne novine 14/10.

ANONIMNO (2010.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini. Narodne novine 7/10.

ANONIMNO (2010.c): Naredba o izmjeni i dopuni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini. Narodne novine 33/10.

ANONIMNO (2010.d): Naredba o izmjeni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini. Narodne novine 37/10.

ANONIMNO (2011.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2011. godini. Narodne novine 11/11.

ANONIMNO (2011.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2011. godini. Narodne novine 1/11.

ANONIMNO (2011.c): Naredba o izmjenama i dopuni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2011. godini. Narodne novine 72/11.

ANONIMNO (2011.d): Naredba o izmjenama i dopunama Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2011. godini. Narodne novine 107/11.

ANONIMNO (2011.e): Pravilnik o načinu prijave bolesti životinja. Narodne novine 62/11.

ANONIMNO (2011.f): Pravilnik o izmjeni Pravilnika o načinu prijave bolesti životinja. Narodne novine 114/11.

ANONIMNO (2012.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012. godini. Narodne novine 30/12.

ANONIMNO (2012.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012. godini. Narodne novine 17/12.

ANONIMNO (2012.c): Naredba o izmjenama Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012. godini. Narodne novine 100/12.

ANONIMNO (2013.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2013. godini. Narodne novine 26/13.

ANONIMNO (2013.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2013. godini. Narodne novine 3/13.

ANONIMNO (2013.c): Naredba o izmjenama i dopuni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2013. godini. Narodne novine 49/13.

ANONIMNO (2014.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2014. godini. Narodne novine 18/14.

ANONIMNO (2014.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2014. godini. Narodne novine 160/13.



ANONIMNO (2014.c): Naredba o izmjenama i dopuni Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2014. godini. Narodne novine 112/14.

ANONIMNO (2014.d): Pravilnik o načinu praćenja, prijavi i izvješćivanju o pojavi bolesti životinja. Narodne novine 135/14.

ANONIMNO (2015.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2015. godini. Narodne novine 35/15.

ANONIMNO (2015.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2015. godini. Narodne novine 3/15.

ANONIMNO (2016.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju od 1. travnja do 31. prosinca 2016. godine. Narodne novine 47/16.

ANONIMNO (2016.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju od 1. siječnja do 31. ožujka 2016. godine. Narodne novine 141/15.

ANONIMNO (2016.c): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju od 1. travnja do 31. prosinca 2016. godine. Narodne novine 31/16.

ANONIMNO (2017.a): Naputak o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2017. godini. Narodne novine 16/17.

ANONIMNO (2017.b): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2017. godini. Narodne novine 5/17.

ANONIMNO (2018.): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2018. godini. Narodne novine 10/18.

ANONIMNO (2019.): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2019. godini. Narodne novine 5/19.

ANONIMNO (2020.a): Naputak o načinu provođenja mjera zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju. Narodne novine 86/20.

ANONIMNO (2020.b): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2020. godini. Narodne novine 7/20.

ANONIMNO (2020.c): Pravilnik o prijavi bolesti životinja. Narodne novine 65/20.

ANONIMNO (2020.d): Program nadziranja, praćenja prevalencije i proširenosti infektivne anemije kopitara, virusnog arteritisa konja, leptospiroze i groznice Zapadnog Nila u 2020. godini. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

ANONIMNO (2021.a): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini. Narodne novine 2/21.

ANONIMNO (2021.b): Program nadziranja, praćenja prevalencije i proširenosti infektivne anemije kopitara, virusnog arteritisa konja, leptospiroze i groznice Zapadnog Nila u 2021. godini. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

BALASURIYA, U. B. R., J. ZHANG, Y. Y. GO, N.J. MACLACHIAN (2014.): Experiences with infectious cDNA clones of equine arteritis virus: Lessons learned and insights gained. *Virology* 462-463, 388-403.

BALASURIYA, U. B. R. (2014.): Equine Viral Arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Practice* 30, 543-560.

BALASURIYA, U. B. R., C. M. LEUTENEGGER, J. B. TOPOL, W. H. MCCOLLUM, P. J. TIMONEY, N. J. MACLACHLAN (2002.b): Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods* 101, 21–28.

BALASURIYA, U. B. R., E. J. SNIJDER, H. W. HEIDNER, J. ZHANG, J. C. ZEVENHOVEN-DOBBE, J. D. BOONE, W. H. MCCOLLUM, P. J. TIMONEY, N. J. MACLACHLAN (2007.): Development and characterization of an infectious cDNA clone of the virulent Bucyrus strain of Equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 88, 918–924.

BALASURIYA, U. B. R., H. W. HEIDNER, N. L. DAVIS, M. W. HEIKE, H. M. WAGNER, P. J. HULLINGER, J. F. HEDGES, J. C. WILLIAMS, R. E. JOHNSTON, W. D. WILSON, I. K. LIU, N. J. MACLACHLAN (2002.a): Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine* 20, 1609-1617.

BALASURIYA, U. B. R., J. F. HEDGES, V. L. SMALLEY, A. NAVARRETTE, W. H. MCCOLLUM, P. J. TIMONEY, E. J. SNIJDER, N. J. MACLACHLAN (2004.): Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Gen. Virol.* 85, 379–390.

BALASURIYA, U. B. R., M. CAROSSINO, P. J. TIMONEY (2016.a): Equine viral arteritis: A respiratory and reproductive disease of significant economic importance to the equine industry. *Equine vet. Educ.* 30, 497-512.

BALASURIYA, U. B. R., N. J. MACLACHLAN (2004.): The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 107–129.

BALASURIYA, U. B. R., N. J. MACLACHLAN (2014.): Equine Viral Arteritis. U: *Equine Infectious Diseases* (D. C. Sellon i M. T. Long, ured.), Saunders Elsevier, St. Louis, 2. izdanje, 169-181.

BALASURIYA, U. B. R., S. SARKAR, M. CAROSSINO, Y. Y. GO, L. CHELVARAJAN, R. F. COOK, A. T. LOYNACHAN, P. J. TIMONEY, E. BAILEY (2016.b): Host Factors that Contribute to Equine Arteritis Virus Persistence in the Stallion: an Update. *J. Equine Vet. Sci.* 43, 11-17.

BALASURIYA, U. B. R., Y. Y. GO, N. J. MACLACHLAN (2013.): Equine Arteritis Virus. *Vet. Microbiol.* 167, 93-122.

BANNAI, H., M. NEMOTO, K., TSJIMURA, T YAMANAKA, H. KOKADO, T KONDO (2018.): Evaluation of two enzyme-linked immunosobent assay for the detection of antibodies against equine arteritis virus. *J. Equine Sci.* 29, 111–115.

BARAC Z., Ž. FATOVIĆ, M. ČAČIĆ, N. KORABI, D. TADIĆ, V. TOMŠE - ĐURANEC, M. ŠABANOVIĆ, M. ŠOŠIĆ, P. BAGOVIĆ KOSTELIĆ, M. ČABRAJEC, M. ŠPEHAR, M. DRAŽIĆ, N. BOŽIĆ (2019.): Godišnje izvješće o stanju uzgoja kopitara u Republici Hrvatskoj za 2018. godinu. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

BARBIĆ, LJ., N. TURK, Z. MILAS, V. STAREŠINA, Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, J. MADIĆ (2009.): Seroprevalence of equine viral arteritis in Croatia – variable specificity of immunoenzyme assay in different horse populations. Programme & Proceedings, 8th International Congress of Veterinary Virology, 23.-26.8., Budimpešta, Mađarska, 66.

BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, V. MOJČEC, S. KOVAČ, I. LOJKIĆ, T. BEDEKOVIĆ, N. LEMO, V. STAREŠINA, J. MADIĆ (2012.b): Influence of persistent infection to molecular diagnostic of equine viral arteritis. IXth International Congress of Veterinary Virology: Final program & abstract book, 04.-07.09., Madrid, Španjolska, 226.

BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, V. MOJČEC, S. KOVAČ, M. PERHARIĆ, A. GAŠPAR, N. TURK, Z. MILAS, V. STAREŠINA, J. MADIĆ (2012.a): Virusni arteritis konja - rezultati provođenja propisanih mjera kontrole bolesti na području Republike Hrvatske (2009.-2012.). 5. Hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem - Zbornik radova, 10.-13.10., Tuhelj, Hrvatska, 263-273.

BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, L. RADMANIĆ, J. MADIĆ (2019.): Virusni arteritis konja – nadzor i suzbijanje na području Republike Hrvatske 2009. – 2019. Zbornik radova 6. savjetovanja uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj, 15.03., Kutina, Hrvatska, 9-15.

BISHOP, S. P. (1989.): Animal models of vasculitis. Toxicol. Pathol. 17, 109–117.

BROADDUS, C. C., U. B. BALASURIYA, J. L. WHITE, P. J. TIMONEY, R. A. FUNK, G. R. HOLYOAK (2011.b): Evaluation of the safety of vaccinating mares against equine viral arteritis during mid or late gestation or during the immediate postpartum period. J. Am. Vet. Med. Assoc. 238, 741-750.

BROADDUS, C. C., U.B. BALASURIYA, P. J. TIMONEY, J. L. R. WHITE, C. MAKLOSKI, K. TORRISI, M. PAYTON, G. R. HOLYOAK (2011.a): Infection of embryos following insemination of donor mares with equine arteritis virus infective semen. *Theriogenology* 76, 47-60.

BRYANS, J. T., M. E. CROWE, E. R. DOLL, W. H. MCCOLLUM (1957.): Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* 47, 3-41.

BURGER, D., F. JANETT, M. VIDAMENT, R. STUMP, D. FORTIER, I. IMBODEN, R. THUN (2006.): Immunization against GnRH in adult stallions: effects on semen characteristics, behaviour and shedding of equine arteritis virus. 9. International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Nizozemska, 107-111.

BURKI, F. (1966.): Further properties of equine arteritis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 19, 123–129.

BURKI, F., A. HOFER, N. NOWOTNY (1992.): Objective Data Plead to Suspend Import-Bans for Seroreactors Against Equine Arteritis Virus Except for Breeder Stallions. *J. Appl. Anim. Res.* 1, 31-42.

CAMPOS, J. R., P. BREHENY, R. R. ARAUJO, M. H. T. TROEDSSON, E. L. SQUIRES, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2014.): Semen quality of stallions challenged with the Kentucky 84 strain of equine arteritis virus. *Theriogenology* 82, 1068-1079.

CAROSSINO, M., P. A. LEE, B. NAM, A. SKILLMAN, K. M. SHUCK, P. J. TIMONEY, Y. TSAI, L. MA, H. G. CHANG, H. T. WANG, U. B. R. BALASURIYA (2016.): Development and evaluation of a reverse transcription-insulated isothermal

polymerase chain reaction (RT-iiPCR) assay for detection of equine arteritis virus in equine semen and tissue samples using the POCKIT system. *J. Virol. Methods* 234, 7-15.

CAROSSINO, M., A. T. LOYNACHAN, I. F. CANISSO, R. F. COOK, J. R. CAMPOS, B. NAM, A Y.Y. GO, E. L. SQUIRES, M. H. T. TROEDSSON, T. SWERCZEK, F. DEL PIERO, E. BAILEY, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2017.): Equine Arteritis Virus Has Specific Tropism for Stromal Cells and CD8<sup>+</sup> T and CD21<sup>+</sup> B Lymphocytes but Not for Glandular Epithelium at the Primary Site of Persistent Infection in the Stallion Reproductive Tract. *J. Virol.* 91, e00418-17.

CASTILLO-OLIVARES, J., J. P. TEARLE, F. MONTESSO, D. WESTCOTT, J. H. KYDD, N. J. DAVIS-POYNTER, D. HANNANT (2003.): Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies. *J. Gen. Virol.* 84, 2745–2753.

CHENCHEV, I., G. GEORGIEV, S. JORDANOV, N. NEDELICHEV (2009.): Serological investigation of Equine Viral Arteritis (EVA) in Bulgaria. *J. Hell. Vet. Medical Soc.* 60, 150-153.

CHUNG, C. J., A. L. GRIMM, C. L. WILSON, U. B. R. BALASURIYA, G. CHUNG, P. J. TIMONEY, C. B. BANDARANAYAKA-MUDIYANSELAGE, S. S. LEE, T. C. MCGUIRE (2015.): Enhanced sensitivity of an antibody competitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay using Equine arteritis virus purified by anion-exchange membrane chromatography. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 728–738.

CLARK, I. (1892): Transmission of pink-eye from apparently healthy stallions to mares. *J. Comp. Path.* 5, 261.

- COLE, J. R., R. F. HALL, H. S. GOSSER, J. B. HENDRICKS, A. R. PURSELL, D. SENNE, J. PEARSON, C. GIPSON (1986.): Transmissibility and abortigenic effect of equine viral arteritis in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, 769-771.
- COLLINS, J. K., S. KARI, S. L. RALSTON, D. G. BENNETT, J. L. TRAUB-DARGATZ, A. O. MCKINNON (1987.): Equine viral arteritis at a veterinary teaching hospital. *Prev. Vet. Med.* 4, 389–397.
- CRUZ-LOPEZ, F., R. NEWTON, A. SANCHEZ-RODRIGUEZ, J. IRELAND, L. MUGHINI-GRAS, M. A. MORENO, P. FORES (2017): Equine viral arteritis in breeding and sport horses in central Spain. *Res. Vet. Sci.* 115, 88-91.
- CULLINANE, A. A. (2004): Testing for equine arteritis virus. *Vet. Rec.* 155, 647-648.
- DE BOER, G. F., A. D. OSTERHAUS, J. T. VAN OIRSCHOT, R. WEMMENHOVE (1979.): Prevalence of antibodies to equine viruses in the Netherlands. *Vet. Q.* 1, 65-74.
- DEEKS, J. J., J. P. T. HIGGINS (2010.): Statistical algorithms in Review Manager 5. Dostupno na mrežnoj stranici <https://training.cochrane.org/>, pristup dana 1. lipnja 2022. godine.
- DEL PIERO, F. (2000.): Equine viral arteritis. *Vet. Pathol.* 37, 287–296.
- DOLL, E. R., J. T. BRYANS, R. E. KNAPPENBERGER (1957.b): An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet.* 47, 69–75.
- DOLL, E. R., J. T. BRYANS, W. H. MCCOLLUM, M. E. CROWE (1957.a): Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares; its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* 47, 3–41.



DUTHIE, S., H. MILLS, P. BURR (2008.): The efficacy of a commercial ELISA as an alternative to virus neutralisation test for the detection of antibodies to EAV. *Equine Vet. J.* 40, 182-183.

ECHEVERRIA, M. G., M. R. PECORARO., C. M. GALOSI, M. E. ETCHEVERRIGARAY, E. O. NOSETTO (2003.): The first isolation of equine arteritis virus in Argentina. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 22, 1029-1033.

EICHHORN, W., M. HEILMANN, O.R. KAADEN (1995.): Equine Viral Arteritis with Abortions: Serological and Virological Evidence in Germany. *J. Vet. Med. B* 42, 573-574.

FORTIER, G., M. VIDAMENT, F. DECRAENE, B. FERRY, P.F. DAELS (2002.): The effect of GnRH antagonist on testosterone secretion, spermatogenesis and viral excretion in EVA-virus excreting stallions. *Theriogenology* 58, 425–427.

FUKUNAGA, Y., H. IMAGAWA, E. TABUCHI, AKIYAMA (1981.): Clinical and virological findings on experimental equine viral arteritis in horses. *Bull. Equine Res. Inst.* 18, 110-118.

FUKUNAGA, Y., W. H. MCCOLLUM (1977.): Complement-fixation reactions in equine viral arteritis. *Am. J. Vet. Res.* 38, 2043-2046.

GAUDAIRE, D., S. LAZIC, D. LUPULOVIC, T. PETROVIC, G. LAZIC, N. BERTHET, A. HANSA (2019.): Complete Genome Sequence of an Equine Arteritis Virus Strain Isolated from a Lipizzaner Stallion in 2015 in Serbia. *Microbiol. Resour. Announc.* 8, e00250-19.

GERAGHTY, R. J., J. R. NEWTON, J. CASTILLOOLIVARES, J. M. CARDWELL, J. A. MUMFORD (2003.): Testing for equine arteritis virus. *Vet. Rec.* 152, 478-479.

GILBERT, S. A., P. J. TIMONEY, W. H. MCCOLLUM, D. DEREGT (1997.): Detection of Equine Arteritis Virus in the Semen of Carrier Stallions by Using a Sensitive Nested PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2181–2183.

GLASER, A. L., A. A. F. DE VRIES, P. J. ROTTIER, M. C. HORZINEK, B. COLENBRANDER (1996.): Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet. Q.* 18, 95–99.

GLASER, A. L., E. D. CHIRNSIDE, M. C. HORZINEK, A. A. F DE VRIES (1997.): Equine arteritis virus. *Theriogenology* 47, 1275-1295.

GO, Y. Y. (2011.a): Literature review. U: Molecular and genomic approaches to understanding host-virus interactions in shaping the outcome of equine arteritis virus infection. Disertacija, University of Kentucky, Sjedinjene Američke Države, 1–55.

GO, Y. Y., E. BAILEY, D. G. COOK, S. J. COLEMAN, J. N. MACLEOD, K. C. CHEN, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2011.b): Genome-wide association study among four horse breeds identifies a common haplotype associated with in vitro CD3+ T cell susceptibility/resistance to equine arteritis virus infection. *J. Virol.* 85, 13174–13184.

GO, Y. Y., E. BAILEY, P. J. TIMONEY, K. M. SHUCK, U. B. R. BALASURIYA (2012.a): Evidence that in vitro Susceptibility of CD3+ T lymphocytes to equine arteritis virus infection reflects genetic predisposition of naturally infected stallions to become carriers of the virus. *J. Virol.* 86, 12407-12410.

GO, Y. Y, R. F. COOK, J. Q. FULGÊNCIO, J. R. CAMPOS, P. HENNEY, P. J. TIMONEY, D. W. HOROHOV, U. B. R. BALASURIYA (2012.b): Assessment of correlation between in vitro CD3+ T cell susceptibility to EAV infection and clinical outcome following experimental infection. *Vet. Microbiol.* 157, 220–225.

GO, Y. Y, Y. LI, Z. CHEN, M. HAN, D. YOO, Y. FANG, and U. B. R. BALASURIYA (2014.): Equine Arteritis Virus Does Not Induce Interferon Production in Equine Endothelial Cells: Identification of Nonstructural Protein 1 as a Main Interferon Antagonist. *Biomed. Res. Int.* ID 420658, 1-13.

GO, Y. Y., E. J. SNIJDER, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2011.c): Characterization of Equine Humoral Antibody Response to the Nonstructural Proteins of Equine Arteritis Virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 268–279.

GOLNIK, W., Z. MICHALSKA, T. MICHALAK (1981.): Natural equine viral arteritis in foals. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 123, 523-533.

GÜR, S., B. İREHAN, M. GÜRÇAY, T. TURAN (2018.): Serological Investigation of Equine Viral Arteritis Infection in Donkeys and Horses in the Eastern Anatolia Region. *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.* 7, 186-191.

GUTHRIE, A. J., P. G. HOWELL, J. F. HEDGES, A. M. BOSMAN, U. B. BALASURIYA, W. H. MCCOLLUM, P. J. TIMONEY, N. J. MACLACHLAN (2003.): Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizzaner stallions in South Africa. *Equine Vet. J.* 35, 596–600.

HBLB (2021.): Code of practice for equine viral arteritis. Dostupno na: Code Of Practice: Home ([hblb.org.uk](http://hblb.org.uk)), pristup mrežnoj stranici 8. lipnja 2022. godine.

HEDGES, J. F., U. B. R. BALASURIYA, P. J. TIMONEY, W. H. MCCOLLUM, N. J. MACLACHLAN (1999.): Genetic Divergence with Emergence of Novel Phenotypic Variants of Equine Arteritis Virus during Persistent Infection of Stallions. *J. Virol.* 73, 3672-3681.

HOLYOAK, G. R., U. B. R. BALASURIYA, C. C. BROADDUS, P. J. TIMONEY (2008.): Equine viral arteritis: Current status and prevention. *Theriogenology* 70, 403-414.

HOSTNIK P., S. MANKOČ, I. TOPLAK, I. KLOBUČAR, T. MALOVRH, J. GROM (2011.): Control of equine arteritis virus (EAV) on stud farm. *Vet. Arh.* 81, 175 -186.

HULLINGER, P. J., I. A. GARDNER, S. K. HIETALA, G. L. FERRARO, N. J. MACLACHLAN (2001.): Seroprevalence of antibodies against equine arteritis virus in horses residing in the United States and imported horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 946-949.

HULLINGER, P. J., W. D. WILSON, P. V. ROSSITTO, J. F. PATTON, M. C. THURMOND, N. J. MACLACHLAN (1998.): Passive transfer, rate of decay, and protein specificity of antibodies against equine arteritis virus in horses from a standardbred herd with high seroprevalence. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 839–842.

ICTV (2022.): Arteriviridae. Dostupno na: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/220/arteriviridae)

[2011/w/posrna\\_viruses/220/arteriviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/220/arteriviridae), pristup mrežnoj stranici 8. lipnja 2022. godine.

JONES, T. C., E. R. DOLL, J. T. BRYANS (1957.): The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.* 47, 52-68.

KONDO, T., Y. FUKUNAGA, K. SEKIGUCHI, T. SUGIURA, H. IMAGAWA (1998.): Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of equine arteritis virus in racehorses. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1043-1045.

KUMAR, S., G. STECHER, K. TAMURA (2016.): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.

LAZIĆ, S., D. LUPULOVIĆ, D. GAUDAIRE, T. PETROVIĆ, G. LAZIĆ, A. HANS (2017): Serological evidence of equine arteritis virus infection and phylogenetic analysis of viral isolates in semen of stallions from Serbia. *BMC Vet. Res.* 13, 316.

LEGRAND, L., P. H. PITEL, G. FORTIER, S. PRONOST, A. CULLINANE (2009.): Testing for antibodies to equine arteritis virus. *Vet. Rec.* 161, 599-600.

LU, Z., A. J. BRANSCUM, K. M. SHUCK, J. ZHANG, E. DUBOVI, P. J. TIMONEY, U.B. BALASURIYA (2008.): Comparison of two real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of Equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20,147–155.

LUCHMAN, J. N. (2014.): Relative Importance Analysis With Multicategory Dependent Variables: An Extension and Review of Best Practices. *Organ. Res. Methods* 17, 452-471.

MACLACHLAN, N. J., U. B. R. BALASURIYA, J. F. HEDGES, T. M. SCHWEIDLER, W. H. MCCOLLUM, P. J. TIMONEY, P. J. HULLINGER, J. F. PATTON (1998.): Serologic response of horses to the structural proteins of equine arteritis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 229–236.

MACLACHLAN, N. J., U. B. R. BALASURIYA, P. V. ROSSITTO, P. A. HULLINGER, J. F. PATTON, W. D. WILSON (1996.): Fatal experimental equine arteritis virus infection of a pregnant mare: immunohistochemical staining of viral antigens. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* 8, 367–374.

MCCOLLUM, W. H. (1976.): Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis virus. *Vet. Microbiol.* 1, 45-54.

MCCOLLUM, W. H., M. E. PRICKETT, J. T. BRYANS (1971.): Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res. Vet. Sci.* 12, 459–464.

MCCOLLUM, W. H., T. V. LITTLE, P. J. TIMONEY, T. W. SWERCZEK (1994.): Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus. *J. Comp. Pathol.* 111, 383–388.

MCFADDEN, A. M., P. V. PEARCE, D. ORR, K. NICOLL, T. G. RAWDON, H. PHARO, M. STONE (2013.): Evidence for absence of equine arteritis virus in the horse population of New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 61, 300–304.

MISZCZAK, F., K. M. SHUCK, Z. LU, Y. Y. GO, J. ZHANG, S. SELLS, A. VABRET, S. PRONOST, G. FORTIER, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2011.): Evaluation of two magnetic-bead-based viral nucleic acid purification kits and three real-time reverse transcription-PCR reagent systems in two TaqMan assays for equine arteritis virus detection in semen. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3694–3696.

MISZCZAK, F., L. LEGRAND, U. B. BALASURIYA, B. FERRY-ABITBOL, J. ZHANG, A. HANS, G. FORTIER, S. PRONOST, A. VABRET (2012.): Emergence of

novel equine arteritis virus (EAV) variants during persistent infection in the stallion: origin of the 2007 French EAV outbreak was linked to an EAV strain present in the semen of a persistently infected carrier stallion. *Virology* 423, 165–174.

MITTELHOLZER, C., T. STADEJEK, I. JOHANSSON (2006.): Extended phylogeny of equine arteritis virus: division into new subgroups. *J. Vet. Med. B.* 53, 55–58.

MOORE, B. D., U. B. BALASURIYA, J. F. HEDGES, N. J. MACLACHLAN (2002.): Growth characteristic of a highly virulent, a moderately virulent and an avirulent strain of equine arteritis virus in primary equine endothelial cells are predictive of their virulence to horses. *Virology* 298, 39-44.

MOORE, B. D., U. B. BALASURIYA, J. L. WATSON, C. M. BOSIO, R. J. MACKAY, N. J. MACLACHLAN (2003.): Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology* 314, 662-670.

MORAILLON, A., R. MORAILLON, B. TRIQUET, M. BERTHELEMY (1978.): Results of an epidemiological investigation on viral arteritis in France and some other European and African countries. *Ann. Rech. Vet.* 9, 43-54.

National Reference Centre for Equine Diseases (CeRME) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, dostupno na stranici: <https://www.izslt.it/cerme/wp-content/uploads/sites/7/2017/06/Adoption-of-a-Centralised-Information-System-for-the-Equine-Viral-Arteritis-Control-Programme-in-Italy-Results-and-Evaluation-Relative-to-the-2004-2007-Breeding-Seasons.pdf>, pristupljeno stranici 2. listopada 2021. godine.

NAM, B., Z. MEKURIA, M. CAROSSINO, G. LI, Y. ZHENG, J. ZHANG, R. F. COOK, K. M. SHUCK, J. R. CAMPOS, E. L. SQUIRES, M. H. T. TROEDSSON, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2019.): Intrahost Selection Pressure Drives Equine Arteritis Virus Evolution during Persistent Infection in the Stallion Reproductive Tract. *J Virol.* 93, e00045-19.

NEU, S. M., P. J. TIMONEY, S. R. LOWRY (1992.): Changes in semen quality following experimental equine arteritis virus infection in the stallion. *Theriogenology* 37, 407-431.

NEWTON, J. R., J. L. WOOD, F. J. CASTILLO-OLIVARES, J. A. MUMFORD (1999.): Serological surveillance of equine viral arteritis in the United Kingdom since the outbreak in 1993. *Vet. Rec.* 145, 511–516.

NEWTON, J. R., R. J. GERAGHTY, J. CASTILLO-OLIVARES, J. M. CARDWELL, J. A. MUMFORD (2004.): Evidence that use of an inactivated equine herpesvirus vaccine induces serum cytotoxicity affecting the equine arteritis virus neutralisation test. *Vaccine* 22, 4117-4123.

NUGENT, J. R. SINCLAIR, A. A. DEVRIES, R. Y. EBERHARDT, J. CASTILLO-OLIVARES, N. DAVIS POYNTER, P. J. ROTIER, J. A. MUMFORD (2000.): Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (G(L)) of equine arteritis virus. *J. Virol. Methods* 90, 167–183.

OIE (2014.): Self-declaration of New Zealand 's freedom from equine arteritis virus. Ministry for Primary Industries, Wellington Ref: OIE Bulletin No. 2014-4.



OIE (2018.): Terrestrial manual. Chapter 3.5.10. Equine viral arteritis (infection with equine arteritis virus) (NB: Version adopted in May 2013.) Dostupno na: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.05.10\\_EVA.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.10_EVA.pdf), pristupljeno stranici 7. ožujka 2021. godine.

OIE (2021.): Terrestrial Animal Health Code. Chapter 12.9. Infection with equine arteritis virus. Dostupno na: [https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre\\_eav.htm](https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_eav.htm), pristupljeno stranici 18. kolovoza 2021. godine.

OIE-WAHIS (2022.): OIE World Animal Health Information System WAHIS (woah.org), pristupljeno stranici 6. lipnja 2022. godine.

OTZDORFF, C., J. BECKMANN, L. S. GOEHRING (2021.): Equine Arteritis Virus (EAV) Outbreak in a Show Stallion Population. *Viruses* 13, 2142.

PAGANO, M., GAUVREAU, K. (2000.): Principles of biostatistics. 2nd ed. Belmont, CA: Brooks/Cole.

PAWESKA, J. T., H. AITCHISON, E. D. CHIRNSIDE, B. J. BARNARD (1996.): Transmission of the South African asinine strain of equine arteritis virus (EAV) among horses and between donkeys and horses. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 63, 189-196.

PAYNE, S. (2017.): Family Arteriviridae. U: *Viruses*, Elsevier, 159-163.

PETRIE, A., P. WATSON (2013.): Statistics for Veterinary and Animal Science. Third edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

PFAHL, K., C. CHUNG, M. D. SINGLETON, K. M. SHUCK, Y. Y. GO, J. ZHANG, J. CAMPOS, E. ADAMS, D. S. ADAMS, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA

(2016.): Further evaluation and validation of a commercially available competitive ELISA (cELISA) for the detection of antibodies specific to equine arteritis virus (EAV). Vet. Rec. 178, 95-95.

POLJAK, F., D. TADIĆ, M. ŠABANOVIĆ, M. ŽALAC, M. ČABRAJEC, P. BAGOVIĆ (2013.): Konjogojstvo, godišnje izvješće za 2013. godinu. Hrvatska poljoprivredna agencija.

POLJAK, F., D. TADIĆ, V. TOMŠE, M. ŠABANOVIĆ, M. ŠOŠIĆ, P. BAGOVIĆ, M. ČABRAJEC (2014.): Konjogojstvo, godišnje izvješće za 2014. godinu. Hrvatska poljoprivredna agencija.

POLJAK, F., D. TADIĆ, V. TOMŠE, M. ŽALAC, M. ŠOŠIĆ, P. BAGOVIĆ, M. ČABRAJEC, I. NIKŠA (2015.): Konjogojstvo godišnje izvješće za 2015. godinu. Hrvatska poljoprivredna agencija.

PRONOST, S., P. H. PITEL, F. MISZCZAK, L. LEGRAND, C. MARCILLAUD-PITEL, M. HAMON, J. TAPPREST, U.B.R. BALASURIYA, F. FREYMUTH, G. FORTIER (2010.): Description of the first recorded major occurrence of equine viral arteritis in France. Equine Vet. J. 42, 713-720.

PRVANOVIĆ, N., M. CERGOLJ, M. ČAČIĆ, A. GAŠPAR, S. HORVAT, J. GRIZELJ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, T. DOBRANIĆ (2008.): Utjecaj pasmine, pariteta i dobi na uspješnost rasplodne sezone i postotak koncepcije kobila. Zbornik radova 4. hrvatskog veterinarskog kongresa, Šibenik, Hrvatska, 239-245.

R CORE TEAM (2021.): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REED, L. J., H. MUENCH (1938.): A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-497.

ROLA, J., M. LARSKA, J. G. ROLA, S. BELÁK, G. L. AUTORINO (2011.): Epizootiology and phylogeny of equine arteritis virus in hucul horses. *Vet. Microbiol.* 148, 402-407.

ROLA, J., W. SOCHA, J. F. ZMUDZINSKI (2013.): Sequence analysis of ORFs 5, 6 and 7 of equine arteritis virus during persistent infection of the stallion - a 7-year study. *Vet. Microbiol.* 164, 378-382.

ROSE, B. V., M. FIRTH, B. MORRIS, J. M. ROACH, D. C. WATHES, K. L. P. VERHEYEN, A. M. DE MESTRE (2018.): Descriptive study of current therapeutic practices, clinical reproductive findings and incidence of pregnancy loss in intensively managed thoroughbred mares. *Anim. Reprod. Sci.* 188, 74-84.

SARKAR, S., L. CHELVARAJAN, Y. Y. GO, F. COOK, S. ARTUISHIN, S. MONDAL, K. ANDERSON, J. EBERTH, P. J. TIMONEY, T. S. KALBFLEISCH, E. BAILEY, U. B. BALASURIYA (2016.): Equine Arteritis Virus Uses Equine CXCL16 (EqCXCL16) as an Entry Receptor. *J. Virol.* 90, 3366-3384.

SHEKIN, D. J. (2004.): Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Third Edition. Boca Raton: Chapman & Hall /CRC.

SNIJDER, E. J., Y. VAN DER MEER, J. ZEVENHOVEN-DOBBE, J. J. M. ONDERWATER, J. VAN DER MEULEN, H. K. KOERTEN, A. M. MOMMAAS (2006.): Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. *J. Virol.* 80, 5927–5940.

SOCHA, W, P. SZTROMWASSER, M. DUNOWSKA, B. JAKLINSKA, J. ROLA (2020.): Spread of equine arteritis virus among Hucul horses with different EqCXCL16

genotypes and analysis of viral quasispecies from semen of selected stallions. *Sci. Rep.* 10, 2909.

SPILMAN, M. S., C. WELBON, E. NELSON, T. DOKLAND (2009.): Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J. Gen. Virol.* 90, 527-535.

STADEJEK, T, H. BJORKLUND, C. R. BASCUNANA (1999.): Genetic diversity of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 80, 691–699.

STEINBACH, F., D. G. WESTCOTT, S. L. MCGOWAN, S. S. GRIERSON, J. P. FROSSARD, B. CHOUDHURY (2015.): Re-emergence of a genetic outlier strain of equine arteritis virus: Impact on phylogeny. *Virus Res.* 202, 144-150.

SUMMERS-LAWYER, K. A., Y. Y. GO, Z. LU, et al. (2011): Response of stallions to primary immunization with a modified live equine viral arteritis vaccine. *J. Equine Vet. Sci.* 31, 129-138.

SURMA-KURUSIEWICZ, K., S. WINIARCZYK, L. ADASZEK (2013.): Comparative analysis of ORF5 nucleotide sequences and amino acid sequences of the GP5 protein of equine arteritis virus (EAV) detected in the semen of stallions from Eastern Poland. *Vet. Sci. Res. J.* 94, 361-367.

SZEREDI, L., A. HORNYAK, B. DENES, M. RUSVAI (2003.): Equine Viral Arteritis in a Newborn Foal: Parallel Detection of the Virus. *J. Vet. Med. B* 50, 270–274.

TALAFHA, A. Q., S. M. ABUTARBUSH, D. L. RUTLEY (2016.): Epidemiologic Status of Equine Viral Arteritis, Equine Infectious Anemia, and Glanders in Jordan, *J. Equine Vet. Sci.* 42, 52-56.

TIBCO Software Inc. (2020.): Data Science Workbench, version 14. <http://tibco.com>.

TIMONEY, P. J., W. H. MCCOLLUM, T. W. MURPHY A. W. ROBERTS, J. G. WILLARD, G. D. CARSWELL (1987.): The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 95–102.

TIMONEY, P. J., C. A. BRUSER., W. H. MCCOLLUM, G. R. HOLYOAK., T. V. LITTLE (2004.): Comparative sensitivity of LLC-MK2, RK-13, vero and equine dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA, pp 26–27.

TIMONEY, P. J., W. H. MCCOLLUM (1988.): Equine viral arteritis: epidemiology and control. *Vet. Sci.* 8, 54-59.

TIMONEY, P. J., W. H. MCCOLLUM, (1993.): Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North. Am Equine Practice.* 9, 295–309.

TIMONEY, P. J., W. H. MCCOLLUM, A. W. ROBERTS, T. W. MURPHY (1986.): Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Vet. Sci. Res. J.* 41, 279-280.

USDA-APHIS (2004.): United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. Equine viral arteritis: Uniform Methods and Rules.

VAALA, W. E., A. N. HAMIR, E. J. DUBOVI, P. J. TIMONEY, B. RUIZ (1992.): Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in neonatal thoroughbred. *Equine Vet. J.* 24, 155-158.

VAIRO, S., A. VANDEKERCKHOVE, L. STEUKERS, S. GLORIEUX, W. VAN DEN BROECK, H. NAUWYNCK (2012.): Clinical and virological outcome of an infection with the Belgian equine arteritis virus strain 08P178. *Vet. Microbiol.* 157, 333–344.

VAIRO, S., W. VAN DEN BROECK, H. FAVOREEL, A. SCAGLIARINI, H. NAUWYNCK (2013.): Development and use of a polarized equine upper respiratory tract mucosal explant system to study the early phase of pathogenesis of a European strain of equine arteritis virus. *Vet. Res.* 44, 22.

WAGNER, H. M., U. B. R. BALASURIYA, J. N. MACLACHLAN (2003.): The serologic response of horses to equine arteritis virus as determined by competitive enzyme-linked immunosorbent assays (c-ELISAs) to structural and non-structural viral proteins. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 251–260.

WEBER, H., K. BECKMANN, L. HAAS (2006.): Case report: equine arteritis virus (EAV) as the cause of abortion in alpacas? *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 113, 162-163.

WEBER, R., R. HOSPES, A. WEHREND (2018.): Abortursachen beim Pferd – eine Übersicht der Literatur und eigene Auswertungen. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere* 46, 35-42.

WESTCOTT, D. G., D. P. KING, T.W. DREW, N. NOWOTNY, J. KINDERMANN, D. HANNANT, S. BELÁK, D. J. PATON (2003.): Use of an internal standard in a closed

one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.* 34, 165-176.

ZHANG, J., F. MISZCZAK, S. PRONOST (2007.): Genetic variation and phylogenetic analysis of 22 French isolates of equine arteritis virus. *Arch. Virol.* 152, 1977–1994.

ZHANG, J., D. A. STEIN, P. J. TIMONEY, U. B. R. BALASURIYA (2010.a): Curing of HeLa cells persistently infected with equine arteritis virus by a peptide-conjugated morpholino oligomer. *Virus Res.* 150, 138–142.

ZHANG, J., P. J. TIMONEY, K.M. SHUCK, G. SEOUL, Y.Y. GO, Z. LU, D.G. POWELL, B.J. MEADE, U.B.R. BALASURIYA (2010.b): Molecular epidemiology and genetic characterization of equine arteritis virus isolates associated with the 2006-2007 multi-state disease occurrence in the USA. *J. Gen. Virol.* 91, 2286–2301.

ZHANG, J., Y. Y. GO, C. M. HUANG, B. J. MEADE, Z. LU, E. J. SNIJDER, P. J. TIMONEY, U. B. BALASURIYA (2012.): Development and characterization of an infectious cDNA clone of the modified live virus vaccine strain of equine arteritis virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1312-1321.

## 9. PRILOZI

### 9.1. Popis slika

Slika 1. Građa virusa. EAV čestica sastoji se od nukleokapside (N) i 7 ovojničnih proteina, koji uključuju 2 glavna proteina ovojnice (GP5 i M koji čine dimer), 3 manja ovojnična glikoproteina (GP2, GP3 i GP4 koji čine trimer) te dva druga manja proteina ovojnice (E i ORF5a protein). Prilagođeno iz BALASURIYA, 2014. ....	14
Slika 2. Prijenos uzročnika EAV i posljedice u populaciji kopitara. Prilagođeno iz BALASURIYA i sur., 2016.a.....	17
Slika 3. Rezultat infekcije EAV. Prilagođeno iz: BALASURIYA, 2014. ....	21
Slika 4. Grafički prikaz broja pretraženih konja po godinama .....	55
Slika 5. Republika Hrvatska podijeljena na tri regije za potrebe istraživanja .....	56
Slika 6. Broj pretraženih konja prema regijama Republike Hrvatske u razdoblju istraživanja (2010.-2015.).....	56
Slika 7. Broj konja u istraživanom razdoblju (2010. – 2015.) za koje je na popratnom obrascu bila jednoznačno istaknuta pojedina analizirana značajka .....	57
Slika 8. Grafički prikaz dobne strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH.....	58
Slika 9. Grafički prikaz spolne strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH.....	60
Slika 10. Grafički prikaz strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH po kategorijama pretraženih životinja .....	61



Slika 11. Grafički prikaz strukture konja obuhvaćenih istraživanjem u različitim regijama RH po pasminama pretraživanih životinja .....	61
Slika 12. Shematski prikaz plitice i jažica koje se koriste za kontrolu stanica i različita razrjeđenja virusa pri titraciji virusa VAK za korištenje u VN-testu .....	71
Slika 13. Shema prve plitice u postupku izvođenja VN-testa na kojoj se izvodi kontrola stanica, povratna titracija virusa, pretraživanje kontrolnih seruma i pretraživanje dva uzorka .....	74
Slika 14. Shema ostalih plitica na kojima se dvostruko pretražuje svaki uzorak serum	74
Slika 15. Shematski prikaz dodavanja pozitivnog i negativnog seruma te pretraživanih seruma na mikrotitracijsku pliticu sadržanu u kompletu ID Screen® Equine Viral Arteritis Indirect (PK – pozitivni kontrolni serum, NK – negativni kontrolni serum, P- pretraživani serumi) .....	82
Slika 16. Shematski prikaz dodavanja pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma te pretraživanih seruma na mikrotitracijske plitice sa i bez vezanog antigena sadržane u kompletu Ingezim Arteritis 2.0 .....	85
Slika 17. Grafički prikaz seroprevalencije virusnog arteritisa konja na području Republike Hrvatske u razdoblju 2010. – 2015. godine .....	102
Slika 18. Grafički prikaz seroprevalencije VAK prema regijama RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine .....	103
Slika 19. Grafički prikaz broja uzoraka i titrova neutralizirajućih protutijela u pozitivnim arhivskim serumima konja određeni VN-testom .....	138
Slika 20. Dokaz umnoženog odsječka nukleotidnog slijeda elektroforezom u gelu ....	146
Slika 21. Filogenetska analiza nukleotidnih slijedova ORF 5 gena EAV izdvojenih na području RH .....	149

## 9.2. Popis tablica

Tablica 1. Seroprevalencija VAK na području RH i po županijama u razdoblju od 2009. do 2015. godine i ukupno u istraživanom razdoblju .....	101
Tablica 2. Seroprevalencija VAK prema regijama RH po godinama od 2010. do 2015. godine i sveukupno u istraživanom razdoblju .....	104
Tablica 3. Seroprevalencija u pojedinoj regiji u odnosu na seroprevalenciju u RH u istoj godini istraživanja .....	105
Tablica 4. Godišnja seroprevalencija u pojedinoj regiji u usporedbi sa seroprevalencijom u istoj regiji tijekom cijelog istraživanog razdoblja (2010.-2015.) .....	106
Tablica 5. Seroprevalencija VAK prema dobi i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015. ....	111
Tablica 6. Značaj seroprevalencije VAK u pojedinim dobnim skupinama u odnosu na ukupnu seroprevalenciju u pojedinoj godini u istoj regiji .....	112
Tablica 7. Značaj seroprevalencije VAK za dobne skupine u pojedinoj regiji u odnosu na prosjek seroprevalencije dobne skupine na području RH u istoj godini .....	113
Tablica 8. Seroprevalencija VAK prema spolu i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015. ....	116
Tablica 9. Utjecaj spola na seroprevalenciju VAK u pojedinim godinama obuhvaćenim istraživanjem i sveukupno u istraživanom razdoblju 2010. – 2015. ....	117
Tablica 10. Seroprevalencija VAK prema kategoriji i regijama pretraženih životinja u razdoblju 2010. – 2015. ....	122
Tablica 11. Utjecaj kategorije na seroprevalenciju VAK u odnosu na ukupnu seroprevalenciju VAK u istoj regiji za svaku pojedinu godinu i ukupno .....	123

Tablica 12. Omjer izgleda seropozitivnog nalaza u različitim kategorija u Istočnoj u odnosu na Središnju Hrvatsku za pojedinu godinu istraživanja i sveukupno .....	124
Tablica 13. Omjer izgleda seropozitivnog nalaza za određenu kategoriju u pojedinoj godini u odnosu na cjelokupno razdoblje iste kategorije i regije.....	125
Tablica 14. Seroprevalencija VAK prema pasminama i regijama pretraženih životinja .....	129
Tablica 15. Utjecaj pasmine na seroprevalenciju VAK po godinama i tijekom cijelog razdoblja istraživanja u odnosu na cjelokupnu seroprevalenciju u istoj regiji.....	130
Tablica 16. Statistička analiza određenih epizootioloških značajki na seropozitivnost logističkom regresijom .....	132
Tablica 17. Procjena opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH u razdoblju od 2013. do 2015. godine temeljem broj pastuha i kobila.....	134
Tablica 18. Procjena opsega provođenja mjera nadzora VAK na području RH u razdoblju od 2013. do 2015. godine temeljem broj registriranih rasplodnih pastuha i kobila.....	135
Tablica 19. Broj popratnih obrazaca zaprimljenih uz uzorke seruma za serološku pretragu na VAK s jednoznačno naznačenom pojedinom značajkom životinje .....	136
Tablica 20. Usporedba rezultata VN-testa i komercijalnih ELISA testova za serume konja s pozitivnim nalazom VN-testa.....	140
Tablica 21. Usporedba rezultata VN-testa i komercijalnih ELISA testova za serume konja s negativnim nalazom VN-testa .....	141
Tablica 22. Podudarnost rezultata serološkog pretraživanja arhivskih seruma konja na VAK korištenjem različitih seroloških metoda .....	143
Tablica 23. Osjetljivost, specifičnost i pouzdanost komercijalnih ELISA testova .....	144
Tablica 24. Podaci o pastusima iz čijih uzoraka ejakulata je izdvojena i pohranjena RNK korištena u istraživanju. ....	147

### 9.3. Popis kratica

CI = interval povjerenja

cPs = centipaskasekundi - jedinica dinamičke viskoznosti

CPU = citopatogeni učinak

CTL = citotoksični T- limfociti

DIVA = program razlikovanja zaraženih od cijepljenih životinja (engl. Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

EHV = konjski alfaherpesvirus

ELISA = imunoenzimni test (eng. Enzyme Linked Immunoassay)

EU = Europska unija

FTS = fetalni teleći serum

Gn-RH = gonadotropin oslobađajući hormon (eng. Gonadotropin-releasing hormone)

H = hladnokrvne pasmine

HVI = Hrvatski veterinarski institut

ICTV = Međunarodni odbor za taksonomiju virusa

IL = interleukin

IV = metoda izdvajanja virusa

K = kobile

Kat = kategorija

L = lipicanska pasmina

MEM = minimalni esencijalni medij

MIA = imunokemijski test s mikročesticama

OIE = Svjetska organizacija za zdravlje životinja (fr. Office International des Epizooties)

OIE-WAHIS = Jedinствена sveobuhvatna baza podataka putem koje se informacije o zdravstvenoj situaciji životinja izvještavaju i šire diljem svijeta. (OIE World Animal Health Information System)

OMV = oslabljeni, mmodificirani, živi virus

OR = omjer vjerojatnosti

ORF = otvoreni okvir čitanja (eng. Open Reading Frame)

P = pastusi

p = vjerojatnost

Pas = pasmina

PFU = broj jedinica koje stvaraju plak/ broj zaraznih čestica u uzorku

PMO = fosfordiamidatni morfolino oligomeri (engl. *phosporodiamidate morpholino oligomers*)

PPMO = peptidno-konjugirani PMO (engl. *peptide-conjugated PMOs*)

RH = Republika Hrvatska

RK-13 = Stanična kultura RK-13 je linijska stanična kultura na kojoj virus arteritisa konja svojim umnažanjem izaziva citopatogeni učinak

RNK = ribonukleinska kiselina

RT-qPCR = kvantitativna reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR)

RT-PCR = lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SAD = Sjedinjene Američke Države

SE % = seroprevalencija u postocima

SPS sporazum = Sporazum o primjeni sanitarnih i fitosanitarnih mjera

T = toplokrvne pasmine

TCID<sub>50</sub> = virusna doza koja uzrokuje infekciju 50% inficiranih staničnih kultura

TNF- $\alpha$  = faktor tumorske nekroze alfa

USDA-APHIS = Služba za inspekciju zdravlja životinja i bilja Ministarstva  
poljoprivrede SAD-a (eng. Animal and Plant Health Inspection Service United States  
Department of Agriculture)

VAK = virusni arteritis konja

VN-test = virus neutralizacijski test

EAV = virus virusnog arteritisa konja

WTO = Svjetska trgovinska organizacija (eng. *World Trade Organization*)

Ž/O = ždrijebad i omad

## **10. Životopis autora i popis objavljenih znanstvenih radova**

### **10.1. Životopis**

Ljupka Maltar, dr. med. vet., rođena je 8. svibnja 1972. godine u Puli. Nakon srednje škole COUO „Branko Semelić“ (današnja gimnazija) u Puli, upisuje studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu 1991. godine, kojega završava 1999. godine. Zapošljava se u veterinarskoj organizaciji u Puli gdje stječe iskustvo s velikom ali ponajviše malom praksom. Nakon toga odlazi u Zagreb i radi na više mjesta, većinom u veterinarskim veledrogerijama. U siječnju 2006. godine zapošljava se u Ministarstvu poljoprivrede, Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane gdje ostaje do današnjeg dana s time da je kratko vrijeme radila u području kvalitete hrane.

Područje njenog stručnog i znanstvenog interesa je zdravlje životinja, s naglaskom na virusne zarazne bolesti, menadžment i krizno planiranje u području zdravlja životinja.

Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim radionicama i treninzima.

Tijekom svog stručnog i znanstvenog rada sudjelovala je u objavi više znanstvenih i stručnih radova.

Udana je i majka dvoje djece.

## 10.2. Popis radova

### Znanstveni i pregledni radovi

Oraić, Dražen; Beck, Relja; Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana Giovanna; Maltar, Ljupka; Miškić, Tihana; Acinger Rogić, Žaklin; Zrnčić, Snježana *Bonamia exitiosa* in European Flat Oyster (*Ostrea edulis*) on the Croatian Adriatic Coast from 2016 to 2020. // Journal of marine science and engineering, 9 (2021), 9; 929, 11 doi:10.3390/jmse9090929.

Jemeršić, Lorena; Keros, Tomislav; Maltar, Ljupka; Barbić, Ljubo; Vilibić Čavlek, Tajana; Jeličić, Pavle; Đaković Rode, Oktavija; Prpić, Jelena Differences in hepatitis E virus (HEV) presence in naturally infected seropositive domestic pigs and wild boars - an indication of wild boars having an important role in HEV epidemiology. // Veterinarski arhiv, 87 (2017), 6; 651-663 doi: 10.24099/vet.arhiv.170208.

Jemeršić, Lorena; Brnić, Dragan; Prpić, Jelena; Keros, Tomislav; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav Afrička svinjska kuga – nova prijetnja europskom svinjogojstvu. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 45 (2014), 4; 257-267.

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.



### **Stručni radovi**

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**

Pavlak, Marina; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav; Lohman, Ivana Some Experiences of Risk Assessment, Surveillance System and Data Collection in the Republic of Croatia – Classical Swine Fever. // Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis, 47 (2016), 6; 493-503.

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.

### **Znanstveni radovi u zbornicima skupova**

Jemeršić, Lorena; Maltar, Ljupka; Prpić, Jelena; Keros, Tomislav; Janković-Lohman, Ivana; Kiš, Tomislav Program nadzora hepatitisa E u domaćih i divljih svinja - zašto ga provodimo?. // 6.Hrvatski Veterinarski Kongres s međunarodnim sudjelovanjem / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, 2016. str. 249-256.

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.

### **Sažeci u zbornicima i časopisima**

Hađina, Suzana; Stevanović, Vladimir; Kovač, Snježana; Vilibić Čavlek, Tatjana; Perharić, Matko; Starešina, Vilim; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav; Madić, Josip; Barbić, Ljubo Serological evidence of tick borne encephalitis virus infections in dogs in Croatia – importance for the veterinary medicine and public health. // 7th International Congress „Veterinary Science and Profession“ Zagreb, 2017. str. 59-59.

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.