

# Ovce kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila

---

**Mašović, Viktor**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**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:178:809202>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Viktor Mašović

Ovce kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila

Diplomski rad

ZAGREB, 2023.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom  
Predstojnik: Prof. dr. sc. Vilim Starešina

Zavod za uzgoj životinja i stočarsku proizvodnju.  
Predstojnica: Prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin

Mentori: Prof. dr. sc. Ljubo Barbić  
Izv. prof. dr. sc. Maja Maurić Maljković

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Vilim Starešina
2. Prof. dr. sc. Nevenka Rudan
3. Izv. prof. dr. sc. Maja Maurić Maljković
4. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić (zamjena)

## **POPIS KRATICA**

CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*)

ELISA – imunoenzimni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

HAPIH – Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu

IgG – imunoglobulini razreda G

IgM – imunoglobulini razreda M

VN – test – virus neutralizacijski test

OR – omjer izgleda (engl. *Odds ratio*)

RH – Republika Hrvatska

TBEV – virus krpeljnog encefalitisa (engl. *Tick-borne encephalitis virus*)

USUV – Usutu virus

WNND – neurološki oblik bolesti Zapadnog Nila (engl. *West Nile Neurological Disease*)

WNV – virus Zapadnog Nila (engl. *West Nile virus*)

WOAH – Svjetska zdravstvena organizacija za zdravlje životinja (engl. *World Organisation for Animal Health*)

## **POPIS PRILOGA**

Slika 1. Lokacije prikupljenih uzoraka

Slika 2. Prevalencije flaviviridnih infekcija na promatranim lokacijama

Slika 3. Prevalencija infekcije WNV na promatranim lokacijama

Slika 4. Prevalencija infekcije TBEV na promatranim lokacijama

Tablica 1. Seroprevalencija infekcija flavivirusima u ovaca s područja Vukovarsko-srijemske županije određena VN-testom

Tablica 2. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija flavivirusima

Tablica 3. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija WNV

Tablica 4. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija TBE virusom

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Ljubi Barbiću i izv. prof. dr. sc. Maji Maurić Maljković na strpljenju i stručnom vodstvu prilikom pisanja ovoga rada. Zahvaljujem i radnom osoblju Veterinarske stanice Vukovar d.o.o., pogotovo radnom osoblju Ambulanta Vukovar 2 prilikom pomoći u uzimanju uzoraka i daljnjem usavršavanju u veterinarskoj struci.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	4
3. MATERIJAL I METODE .....	5
Plan rada.....	5
Uzorkovanje .....	5
Epizootiološki podaci.....	6
Imunoenzimni test (ELISA).....	6
Virus neutralizacijski test (VN – test) .....	7
Statistička obrada rezultata .....	8
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA .....	17
6. ZAKLJUČCI.....	20
7. LITERATURA.....	21
8. SAŽETAK.....	25
9. SUMMARY .....	26
10. ŽIVOTOPIS.....	27

## 1. UVOD

Virus Zapadnog Nila (engl. *West Nile virus* - WNV) je zoonotski virus kojeg prenose komarci te pripada rodu *Flavivirus* (serološki pripada u antigensku skupinu virusa Japanskog encefalitisa) s globalnom geografskom proširenošću. WNV uzrokuje klinički manifestnu bolest u ptica, konja i ljudi, a klinička slika varira od asimptomatske, blage febrilne bolesti do neuroinvazivne bolesti s mogućim smrtnim ishodom. Virus se u svojem prirodnom ciklusu održava u različitim vrsta ptica, koje su rezervoari s mogućom dugotrajnom viremijom, a primarni prijenosnici su komarci. Ljudi i konji su slučajni i krajnji domaćini koji uslijed niske razine viremije, neovisno o kliničkoj manifestaciji, ne predstavljaju izvor infekcije (HERNÁNDEZ-JOVER i sur., 2013.). Glavni vektor WNV u Europi je komarac *Culex pipiens*, koji omogućava endemizaciju bolesti prezimljavanjem u ženka te prenošenjem virusa na potomstvo. Zbog životnog ciklusa komarca i najvećeg broja aktivnih jedinki tijekom toplijeg dijela godine, bolest Zapadnog Nila ima izraziti sezonski karakter te se oboljenja najčešće pojavljuju tijekom ljeta (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Prijenosnici mogu biti i druge vrste komaraca, ali s manjim vektorskim kapacitetom. Virus je izoliran i iz krpelja porodice *Ixodidae* i krpelja porodice *Argasidae* na endemičnim područjima Europe, Afrike i Azije međutim njihova uloga u prijenosu je od manjeg značaja (HENDERSON LAWRIE i sur., 2004.).

Infekcija WNV u ptica može biti asimptomatska, ali i uzrokovati bolest koja se očituje različitim neurološkim kliničkim znakovima u vidu ataksije, paralize i inkoordinacije te ponekad depresijom, letargijom i miokarditisom. Tijek bolesti je najčešće perakutan te se uginuće ptica u pravilu dogodi u roku od 24 sata nakon pojave kliničkih znakova. Odstupanja od navedenoga su uvjetovana i vrstom inficiranih ptica. U konja WNV može biti asimptomatska ili uzrokuje bolest koja se očituje vrućicom sa simptomima sličnim influenci. Bolest se može očitovati i različitim znakovima oboljenja središnjeg živčanog sustava (ataksija, slabost mišića, gubitak vida). Bolest traje nekoliko tjedana, a u slučaju neuroloških oblika smrtnost je visoka. Bolest Zapadnog Nila je značajna emergentna zoonoza (BLITVICH, 2008.). U ljudi 80 % infekcija WNV je asimptomatsko, a u 20 % slučajeva razvije se oblik bolesti koji može uključivati groznicu Zapadnog Nila ili neurološki oblik bolesti (engl. *West Nile Neurological Disease* - WNND) (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Osobe starije životne dobi sklonije su razvoju neurološkog oblika bolesti koji može rezultirati smrtnim ishodom. Potrebno je istaknuti i da među onima koji prebole, u značajnog broja ostaju trajne posljedice u vidu neuroloških deficita. U ljudi starijih od 70 godina, letalitet se kreće između 15% i 29% (COLPITTS i sur., 2012.).



U Republici Hrvatskoj klinička oboljenja u ljudi uzrokovana WNV nisu zabilježeni sve do 2012. godine, kada je zabilježeno sedam slučajeva WNND u tri istočne hrvatske županije (PEM-NOVOSEL i sur., 2014.). Od tada se klinička oboljenja bilježe gotovo svake godine (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Dijagnostika infekcije uzrokovane WNV temelji se na prepoznavanju kliničkih simptoma i provođenju laboratorijskih pretraga (MURRAY i sur., 2011.). Najčešća korištena laboratorijska metoda dijagnostike je imunoenzimni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) koja detektira IgM ili IgG protutijela. Osjetljivost pretrage je između 95 %-100 % za pretraživanje seruma i uzorka cerebrospinalne tekućine (ABADIE KEMMERLY, 2003.). Međutim, sukladno preporuci Svjetske organizacije za zdravlje životinja (engl. *World Organisation for Animal Health* - WOAAH), zbog mogućnosti križnih reakcija s drugim flavivirusima, sve pozitivne rezultate ELISA testom potrebno je pretražiti dodatno potvrdnim metodama poput testa neutralizacije plaka (PRNT) ili virus neutralizacijskim testom (VN-test) uz korištenje drugih cirkulirajućih flavirusa kao antigena (WOAH, 2018.). Na području Republike Hrvatske (RH) uz dokazanu cirkulaciju WNV, stalno je prisutan virus krpelnog encefalitisa (ILIC i sur., 2020.; VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.b), a bilježe se i povremene infekcije životinja i ljudi Usutu virusom (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2020.). Uz križnu reakciju u serološkom pretraživanju ELISA metodom važno je istaknuti i sličnost kliničkog očitovanja te moguće istovremene cirkulacije više flavirusa (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2014.; SANTINI i sur., 2015.).

Sukladno međunarodnim smjernicama za nadzor, prevenciju i kontrolu virusa Zapadnog Nila, nadzor WNV se sastoji od dva različita, ali nadopunjujuća dijela. Epidemiološka istraživanja WNV kojima je cilj ustanoviti sezonalnost virusa, geografski i demografski obrazac pojave u ljudi te mortalitet i morbiditet koji virus može uzrokovati u ljudi. Uz navedeno, provodi se i nadzor okoliša s ciljem utvrđivanja aktivnosti vektora virusa (KLOBUČAR i sur., 2021.) i prisustvo virusa u različitim domaćinima prije nego virus inficira ljude (PETROVIĆ i sur., 2018.; VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Pošto je WNV u prirodi prisutan u ptica, koje su i rezervoar virusa, one su izabrane kao adekvatne životinje za nadzor virusne aktivnosti bilo pasivnim nadzorom u divljih ptica ili aktivnim nadzorom u peradi kao sentinel životinja. Vrane i ptice iz porodice vrana su oslonac pasivnog nadzora WNV u Sjevernoj Americi nakon pojave virusa 1999. i 2000. (KOMAR, 2006.), međutim, ovaj tip nadzora u Europi nije dao zadovoljavajuće rezultate. Konji su zbog svoje osjetljivosti na infekciju WNV i visoke imunoreaktivnosti najčešće sentinel životinje od domaćih životinja (STEJSKALOVA i sur., 2019.). Potvrđena je korelacija visoke seroprevalencije WNV u konja s visokim rizikom

oboljenja ljudi na istom području kao i mogućnost potvrde akutnih infekcija konja nekoliko tjedana prije prvih oboljenja ljudi (GARCIA BOCANEGRA i sur., 2012.; VILIBIC-CAVLEK i sur., 2019.). Prednost aktivnog nadzora u konja je i mogućnost korištenja ostalih uzoraka krvi konja dostavljenih u laboratorij u cilju nadzora drugih zaraznih bolesti (BARBIĆ i sur., 2014.).

Poteškoće u provedbi aktivnog nadzora WNV u konja kao sentinel životinja je njihov relativno mali broj, te učestao promet u druge epizootiološke jedinice što se posebice odnosi na toplokrvne konje. Na pojedinim područjima RH populacija konja izrazito je mala ili uopće nisu prisutni. Primjerice, Šibensko-kninska i Dubrovačko-neretvanska županija su prema izvješću Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) iz 2021. godine županije s najmanjim brojem konja. U njima je broj konja 2021. godine iznosio 278 odnosno 168 jedinki (HAPIH, 2021.a). Stoga su načinjena različita istraživanja o mogućnosti korištenja drugih vrsta domaćih životinja kao sentinela. U RH je opisan dokaz protutijela u goveda (BARBIĆ i sur., 2012.), međutim imunoreaktivnost u usporedbi s konjima nije bila primjerena korištenju goveda kao sentinel životinja. Mogućnost korištenja malih preživača kao sentinel životinja nije dostatno istražena te je, prema dostupnim informacijama, do sada provedeno samo jedno istraživanje seroprevalencije u ovaca i koza u Egiptu (SELIM i ABDELHADY, 2022.). Na području Europe ovakvo istraživanje do sada nije provedeno.

Područje Vukovarsko-srijemske županije je području najvišeg rizika od infekcija WNV na području RH. Prema izvješću HAPIH-a iz 2021. godine broj konja u Vukovarsko-srijemskoj županiji iznosio je 1017 jedinki. Od navedenih, 32% su toplokrvnjaci, 5% je ponija, a ostatak su hladnokrvnjaci (HAPIH, 2021.a). U istoj županiji broj ovaca u 2021. godini iznosio je 18988 (HAPIH, 2021.b). Dodatno, s obzirom da se u svim uzgojima ovaca uzorkuje krv za druga laboratorijska pretraživanja (nadzor bruceloze), ovi uzorci su lako dostupni te smo željeli istražiti mogućnost njihovog korištenja kao sentinel životinja za WNV. Vrijednost ovaca kao mogućih sentinel životinja je još i veća s obzirom da je to vrsta sa značajnim porastom populacije, uzgaja se na području cijele RH te borave na vrlo ograničenom geografskom području što su odlike idealnih sentinel životinja.

## 2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Pretpostavka koju želimo provjeriti ovim istraživanjem jest da se ovce mogu koristiti kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila te da će biti serološki pozitivnih životinja na području Vukovarsko-Srijemske županije, području visokog rizika za infekcije WNV u RH.

S obzirom da su istraživanja ovaca kao mogućih sentinel životinja za WNV malobrojna, a nikada nisu provedena u RH niti, prema dostupnim saznanjima, Europi, opći cilj ovoga rada jest po prvi put provjeriti mogućnosti korištenja ovaca kao sentinel životinja za bolest Zapadnog Nila u epizootiološki i epidemiološkim uvjetima Europe.

Nadalje, uz specifični cilj određivanja seroprevalencija infekcije WNV u ovaca na području Vukovarsko-srijemske županije, dodatnim pretraživanjem VN-testom želi se ustanoviti učestalost križnih reakcija uslijed infekcija drugim srodnim flavivirusima prisutnim na području RH (virus krpeljnog encefalitisa (engl. *tick-borne encephalitis virus* - TBEV) i usutu virus (USUV) te ustanoviti prisustvo i učestalost drugih flavivirusnih infekcija u ovaca na području Vukovarsko-Srijemske županije. Također, željeli smo provjeriti čimbenike rizika infekcije WNV, i eventualno drugim flavivirusima, u ovaca.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **Plan rada**

Za provedbu ovog istraživanja planirano je serološko pretraživanje na prisustvo protutijela za virus WNV ostatnih uzoraka seruma ovaca s područja Vukovarsko-srijemske županije, dijela RH s kontinuirano najvišim seroprevalencijama WNV ustanovljenim pretraživanjem konja.

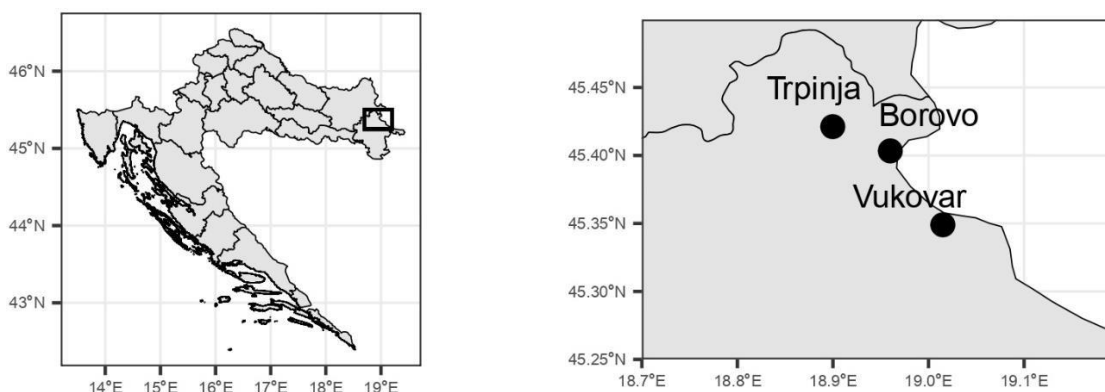
U prvoj fazi pretraživanja svi serumi ovaca pretraživani su komercijalnim imunoenzimnim testom (ELISA) za WNV kao izlučnom metodom. Svi pozitivni serumi pohranjeni su pri  $-18^{\circ}\text{C}$  do dodatnog pretraživanja potvrdnim virus-neutralizacijskim testom (VN-test), a negativni nisu dodatno pretraživani te su se smatrali negativnima. Serumi za koje se pretraživanjem ELISA metodom dobilo sumnjive rezultate, pretraženi su još jednom istom metodom. Serumi ponovljeno pretraženi ELISA metodom koji su bili negativni nisu korišteni u daljnjem pretraživanju, dok su svi oni koji su bili pozitivni ili ponovno sumnjivi pridodani ranije potvrđeno pozitivnim serumima i pretraženi VN-testom. S obzirom da ELISA test nije dostatno specifičan, u izvedbi VN-testa kao antigeni korištena su tri flavivirusa (WNV, TBEV i USUV) kako bi u slučaju križnih reakcija mogli utvrditi infektivni virus temeljem razlika u titrovima dobivenim korištenjem različitih antigena.

#### **Uzorkovanje**

U provedenom istraživanju pretraženo je sveukupno 300 ostatnih uzoraka seruma ovaca uzorkovanih u više uzgoja s područja Vukovarsko-srijemske županije u okviru provođenja mjera kontrole bruceloze u ovaca propisane Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2022. godini (NN 145/2021). Uzorci krvi uzorkovani su venepunkcijom *v. jugularis* te su ostavljeni pri sobnoj temperaturi do zgrušavanja. Nakon zgrušavanja krvi serumi su odvojeni u ependorff epruvete zapremnine 1 ml te su zamrznuti pri  $-18^{\circ}\text{C}$ . Zamrznuti serumi su se nakon prikupljanja transportirali, bez odmrzavanja, u Virološki laboratorij Zavoda za zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su ponovno pohranjeni pri  $-18^{\circ}\text{C}$  do provođenja seroloških pretraga.

## Epizootiološki podaci

Uzorkovanje krvi ovaca provodilo se u suradnji s ovlaštenim veterinarima na području nadležnosti Veterinarske stanice Vukovar d.o.o., Ambulanta Vukovar 2. Uzorci su prikupljeni tijekom svibnja 2022. godine na sedam gospodarstava na području Vukovarsko-srijemske županije. Od navedenih gospodarstava jedno je bilo na području grada Vukovara, dva na području općine Trpinja i četiri na području općine Borovo (Slika 1).



**Slika 1.** Lokacije prikupljenih uzoraka

S ciljem određivanja epizootioloških značajki i rizičnih čimbenika infekcija virusom Zapadnog Nila u ovaca, za svako obuhvaćeno gospodarstvo bilježeni su podaci o životinjama koji su uključivali pasminu, dob, spol, veličinu stada, način držanja, zabilježene kliničke znakove u posljednjih godinu dana te da li se provodi šišanje. Nadalje bilježeni su i podaci vezani uz lokaciju poljoprivrednog gospodarstva koji su obuhvaćali tip vodenih površina u blizini (rijeka, potok ili jezero), udaljenost gospodarstva od vodene površine, udaljenost mjesta držanja ovaca od kućanstva, provođenje dezinfekcije na gospodarstvu te oboljenja ljudi na gospodarstvu u zadnjih godinu dana.

## Imunoenzimni test (ELISA)

U provedenom istraživanju se za dokazivanje IgG protutijela za virus Zapadnog Nila koristio komercijalni komplet za izvođenje imunoenzimnog testa (ELISA) INgezim West Nile Compac (Immunologia y Genetica Aplicada, S.A., Madrid, Španjolska). Pretraživanje je provedeno u skladu s uputama proizvođača. Ovaj test je načinjen na principu blokirajućeg imunoenzimnog

testa te se kao takav može koristiti za različite vrste životinja. Dna jažica u mikrotitracijskim pliticama obložena su antigenom WNV prilikom proizvodnje kompleta. Uzorak seruma koji pretražujemo dodaje se u plitice i ako serum sadrži specifična protutijela, ona se vežu za antigen, a ako ih serum ne sadrži, antigen ostaje slobodan. Poslije toga u plitice se dodaje konjugat, koji sadrži specifična monoklonska protutijela konjugirana enzimom peroksidazom. U slučaju da pretraživani uzorak seruma sadrži specifična protutijela, ona sprječavaju vezanje monoklonskih protutijela za antigen, dok ako ih uzorak seruma ne sadrži, monoklonska protutijela će se vezati za antigen. U procesu ispiranja uklanjamo sve nevezane komponente te zatim u plitice dodajemo supstrat. Pomoću supstrata otkriti ćemo prisutnost ili odsutnost vezanih monoklonskih protutijela, jer supstrat zajedno s peroksidazom razvija kolorimetrijsku reakciju. Dobiveni rezultati nakon obavljenih pretraga očitavao se pomoću čitača mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska) pri valnoj duljini od 450 nm, a konačni rezultat pretrage izračunavao se pripadajućim računalnim programom (Magellan™ software, Tecan, Männedorf, Švicarska). Dobiveni rezultati mogu biti pozitivni, sumnjivi i negativni u skladu s uputama proizvođača oko načina interpretacije. Uzorci pretraživanjem kojih je postignut sumnjiv rezultat su još jednom pretraženi na isti način. Negativni rezultati ponovljenog pretraživanja smatrani su negativnim dok su sumnjivi i pozitivni serumi pridodani pozitivnim iz prvog pretraživanja te svi zajedno pretraženi VN-testom.

### **Virus neutralizacijski test (VN – test)**

Nakon provedenog opisanog pretraživanja ELISA metodom, svi pretraženi serumi s pozitivnim ili ponovljenim sumnjivim rezultatom pretraženi su istodobno VN-testom uz korištenje virusa Zapadnog Nila (WNV), usutu virus (USUV) i virus krpeljnog encefalitsa (TBEV) prema ranije opisanom postupku (ILIĆ i sur., 2020.). Ovo pretraživanje načinjeno je u dvije faze. U prvoj su fazi svi serumi pretraženi u razrijeđenjima 1:5 i 1:10 sa sva tri virusa. Serumi koji su bili negativni pretraživanjem u navedenim razrijeđenjima smatrani su negativnim na korišteni virus, a oni koji su bili pozitivni u titru  $\geq 1:5$  su dodatno pretraženi u razrijeđenjima od 1:5 do 1:640 kako bi im odredili titar protutijela za pojedini korišteni virus.

Za provedbu VN-testa korišteni su slijedeći sojevi virusa: WNV linije 2 izdvojen iz jastreba i USUV linije Europa 2 izdvojen iz kosa (arhivski sojevi Virološkog laboratorija izdvojeni na području RH) i TBEV soj Ljubljana (dobiven kroz European Virus Archive - GLOBAL (EVAg) projekt). Svi navedeni sojevi umnoženi su na linijskoj staničnoj kulturi Vero E6 stanica. Virusi

su korišteni u radnoj dozi od 100 TCID<sub>50</sub>, a titracija sva tri virusa je prethodno načinjena peti dan od infekcije stanica tako da je TCID<sub>50</sub> izračunat pomoću Reed-Muenchove metode.

Prije pretraživanja serumi su inaktivirani pri 56°C tijekom 30 minuta u vodenoj kupelji. Početno razrjeđenje seruma bilo je 1:5, a serumi su pretraživani dvostruko na mikrotitracijskim pliticama s ravnim dnom. Dvostruka serijska razrjeđenja seruma načinjena su dodavanjem 25 µl početnog razrjeđenja u istu količinu medija (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Lonza, Basel, Švicarska). Nakon načinjenih dvostrukih serijskih razrjeđenja 25 µl radne otopine (100 TCID<sub>50</sub>) svakog navedenog virusa na zasebnoj mikrotitracijskoj plitici, dodano je u svaku jažicu s načinjenim razrjeđenjem seruma. Po dodavanju virusa mikrotitracijske plitice su inkubirane pri 37°C u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> tijekom jednog sata. Nakon inkubacije u svaku jažicu dodano je 50 µl suspenzije stanične kulture u DMEM-u s dodatkom 5% toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) koja je sadržavala 2 x 10<sup>5</sup> Vero E6 stanica/ml. U izvođenju pretrage korištene su pozitivna i negativna kontrola kao i kontrola stanica te povratna titracija virusa radi pouzdanosti rezultata. Mikrotitracijske plitice su zatim inkubirane pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> tijekom pet dana. Počevši od trećeg dana inkubacija, jažice su svakodnevno pregledavane radi nastanka citopatogenog učinka. Pretrage su očitavane petog dana, a titar protutijela definiran je kao najveće razrjeđenje seruma koji je postigao 100% neutralizacije virusa. Uzorci seruma s titrom ≥ 1:10 smatrani su pozitivnima. U slučajevima da je uzorak bio pozitivan pretraživanjem s različitim virusima, infektivnim se smatrao onaj čiji je titar najmanje četverostruko veći od ostalih, a ako nije ustanovljena značajna razlika u titru pozitivan rezultat se smatrao dokazom flavivirusne infekcije bez mogućnosti određivanja infektivnog virusa.

### **Statistička obrada rezultata**

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programima R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022.), GraphPad kalkulator kvantificiranja podudarnosti rezultata testova koji je dostupan besplatno na mrežnoj stranici (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>) i MedCalc kalkulator omjera izgleda 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.

Podudarnost rezultata testova izračunata je pomoću kappa statistike. Rezultati su prikazani kappa vrijednošću uz 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval* - CI), a interpretirani prema LANDIS i KOCH (1977.).

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 % CI. Ukoliko su prilikom izračuna u pojedinim poljima bile prisutne nule, vrijednost od 0,5 je dodana svim poljima (PAGANO i GAUVREAU, 2018; DEEKS i HIGGINS, 2010.). P vrijednost je izračunata prema SHESKIN (2004.). U analizi tablica koje su sadržavale više od 4 polja (2x2), poput varijable pasmina i lokacija, korištena je logistička regresija u izračunu OR-a, a značajnost utjecaja same varijable na ishod testa utvrđena je analizom varijance (ANOVA) tipa II.



#### 4. REZULTATI

Rezultati prvim pretraživanjem ELISA testom bili su sljedeći: 82 pozitivnih, 73 negativnih i 145 sumnjivih uzoraka. Ponovljenom ELISA pretragom pretraženi su svi sumnjivi uzorci (145) nakon čega smo dobili završne rezultate: 111 pozitivnih, 80 negativnih i 109 sumnjivih rezultata. Udio pozitivnih uzoraka ELISA metodom u ukupnom broju pretraženih uzoraka (n=300) bio je 37,0 %, udio negativnih 26,7 %, a udio sumnjivih 36,3 %. Svi uzorci koji su bili pozitivni prvim pretraživanjem, odnosno sumnjivi ili pozitivni u ponovljenom istraživanju, pretraženi su dodatno VN-testom uz korištenje kao antigena WNV, USUV i TBEV. Ukupno je VN-testom dodatno pretraženo 220 uzoraka. Od 111 ELISA pozitivnih uzoraka devet (7,2 %) je VN-testom potvrđeno kao pozitivno na WNV, deset (9,0 %) su bili pozitivni na TBEV, a jedan (0,9 %) na flavivirusnu infekciju bez mogućnosti određivanja infektivnog virusa. Od 109 uzoraka koji su pretraživanjem ELISA metodom imali sumnjiv rezultat, jedan (0,9%) je VN-testom potvrđeno kao pozitivan na WNV, 19 (17,4 %) ih je bilo pozitivnih na TBEV, četiri (3,7 %) na USUV te tri (2,8 %) na flavivirusnu infekciju. Od sveukupno 220 uzoraka koji su bili pozitivni ili sumnjivi pretraživanjem ELISA testom za WNV, svega devet uzoraka (4,1 %) je bilo stvarno pozitivno na WNV što smo dokazali pretraživanjem VN-testom. Navedeni rezultati ukazuju na vrlo nisku specifičnost ELISA metode za dijagnostiku infekcija WNV u ovaca. Podudarnost rezultata testova ELISA i VN-testa na sveukupno potvrđene flavivirusne infekcije bila je 33 % ( $\kappa = 0,07$ ,  $SE = 0,02$ ,  $95\% \text{ CI} = 0,03-0,1$ ), a ELISA i VN-testa za WNV 29,73 % ( $\kappa = 0,03$ ,  $SE = 0,01$ ,  $95\% \text{ CI} = 0,01-0,06$ ).

Rezultati pretraživanja virus neutralizacijskim testom bili su sljedeći: 12 pozitivnih rezultata na WNV, 33 pozitivnih na TBEV, šest pozitivnih na USUV. U četiri pretražena seruma zabilježene su križne reakcije i to u dva seruma VN-test je bio pozitivan na WNV i TBEV, jednom na TBEV i USUV, a još jedan serum bio je pozitivan sa sva tri korištena virusa. Prilikom određivanja konačnog titra u ta četiri uzorka nije postojala četverostruka razlika u titru koja bi nam odredila o kojem se infektivnom virusu radi te smo za ta četiri seruma zaključili da se radi o flavivirusnoj infekciji bez mogućnosti određivanja infektivnog virusa. Sveukupno, nakon određivanja titra protutijela VN-testom je potvrđeno devet pozitivnih uzoraka na WNV, 29 pozitivnih na TBEV, četiri pozitivne na USUV virus te četiri uzorka s križnim reakcijama u kojima nismo mogli odrediti dominantni virus te ih smatramo dokazanom flavivirusnom infekcijom bez mogućnosti određivanja infektivnog virusa. Sveukupno seroprevalencija infekcija flavivirusima ovaca s područja Vukovarsko-srijemske županije bila je 15,3 %. Seroprevalencija prema uzročnicima

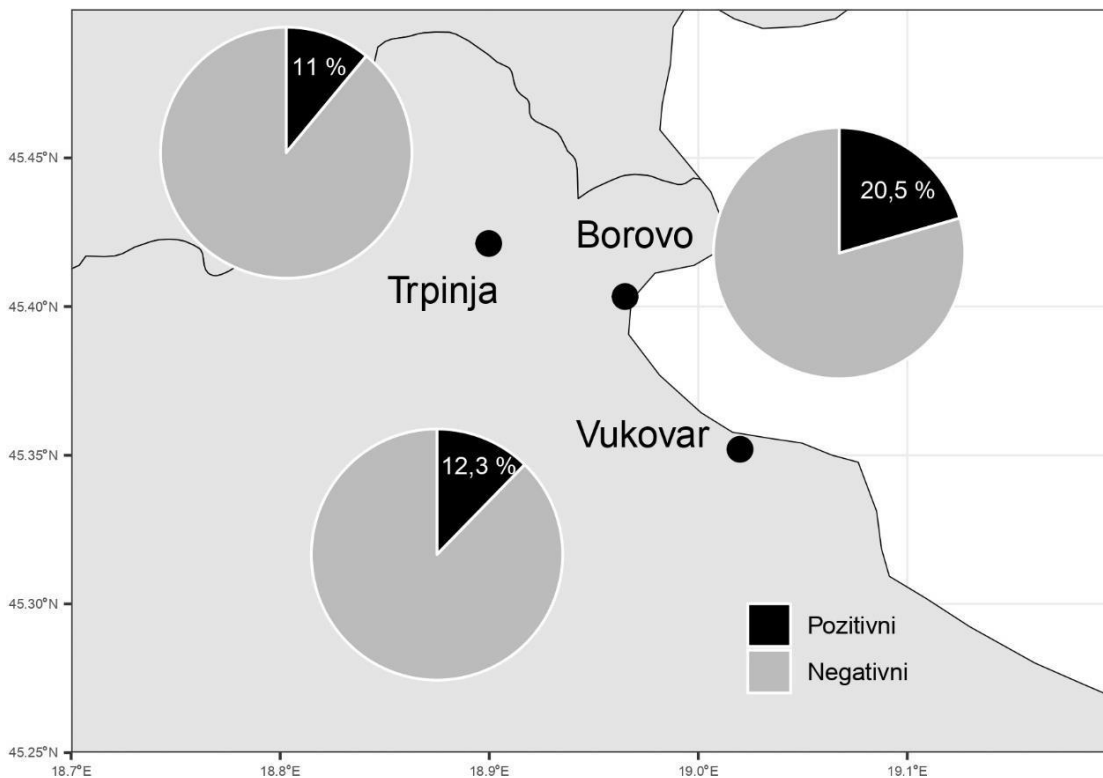
je iznosila za WNV 3,0 %, TBEV 9,7 % i USUV 1,3 %. Uz navedeno još četiri uzoraka (1,3 %) je bilo pozitivno na flavivirusnu infekciju bez mogućnosti određivanja infektivnog virusa. Iz navedenog proizlazi da je učestalost infekcije TBEV na području Vukovarsko-srijemske županije bila 3,46 puta veća u odnosu na infekcije WNV (OR=3,46; 95 % CI=1,61-7,45; p=0,002; Tablica 1).

Gledajući lokacije na kojima borave ovce, najveća seroprevalencija flavivirusnih infekcija zabilježena je u općini Borovo s 20,5 %. Zatim, slijedi grad Vukovar s 12,3 % te općina Trpinja s 11,0 % (Tablica 1, Slika 2). Statističkom analizom bez obzira na navedene razlike utvrđeno je da lokacija nema značan utjecaj na prevalenciju flavirusa (ANOVA, p=0,11). Gledajući lokacije pojedinačno za pojedini virus, općina Borovo se ističe s najvišim udjelom pozitivnih rezultata na TBEV (15,0 %) i najvišim brojem pozitivnih rezultata na WNV (3,9 %) u odnosu na druge dvije lokacije (Tablica 1). Na području općine Borovo nije zabilježeno pozitivnih rezultata na USUV (Tablica 1). Promatrajući učestalost infekcije WNV i TBEV unutar iste lokacije, na području općine Borovo mogućnost infekcije TBEV bila je 4,29 puta veća u odnosu na infekciju WNV (OR=4,29; 95 % CI = 1,55-11,89; p=0,005; Tablica 1). Na lokacijama Trpinja (OR=1,70; 95 % CI = 0,40-7,32; p=0,48) i Vukovar (OR=5,29; 95 % CI = 0,60-46,48; p=0,13) ta razlika nije bila statistički značajna (Tablica 1) iako je na obje lokacije zabilježena viša prevalencija TBEV u odnosu na WNV. Na ove dvije lokacije su dokazane i infekcije USUV.

**Tablica 1.** Seroprevalencija infekcija flavivirusima u ovaca s područja Vukovarsko-srijemske županije određena VN-testom

Seroprevalencija	Lokacija			Vukovarsko-srijemska županija
	Borovo	Trpinja	Vukovar	
WNV	3,9 %*	3,0 %	1,4 %	3,0 %*
TBEV	15,0 %*	5,0 %	6,8 %	9,7 %*
USUV	0,0 %	1,0 %	4,1 %	1,3 %
FLAVI	1,6 %	2,0 %	0,0 %	1,3 %
<b>UKUPNO</b>	20,5 %	11,0 %	12,3 %	15,3 %

\* – statistički značajne razlike u prevalenciji unutar istog stupca



**Slika 2.** Prevalencije flavivirusnih infekcija na promatranim lokacijama

Određivanje čimbenika rizika načinjeno je za sveukupno potvrđene flavivirusne infekcije te za svakog uzročnika zasebno.

Promatrajući utjecaj pasmine kao čimbenika rizika ustanovljena je statistička značajnost u prevalenciji infekcija flavivirusima (ANOVA  $p=0,005$ ). Za ovcu pasmine cigaja utvrđena je 3,34 puta veća mogućnost infekcije od ovce pasmine romanovska (OR=3,34, 95 % CI=1,55-7,61,  $p=0,003$ ). Za udaljenost kućanstva kao čimbenik rizika utvrđen je također statistički značajan utjecaj na prevalenciju infekcijama flavivirusima (Tablica 2) te da povećanjem udaljenosti kućanstva od stada raste vjerojatnost infekcije flavivirusima za 1,92 puta. Za ostale čimbenike rizika nije utvrđen utjecaj na prevalenciju infekcije flavivirusima (Tablica 2).

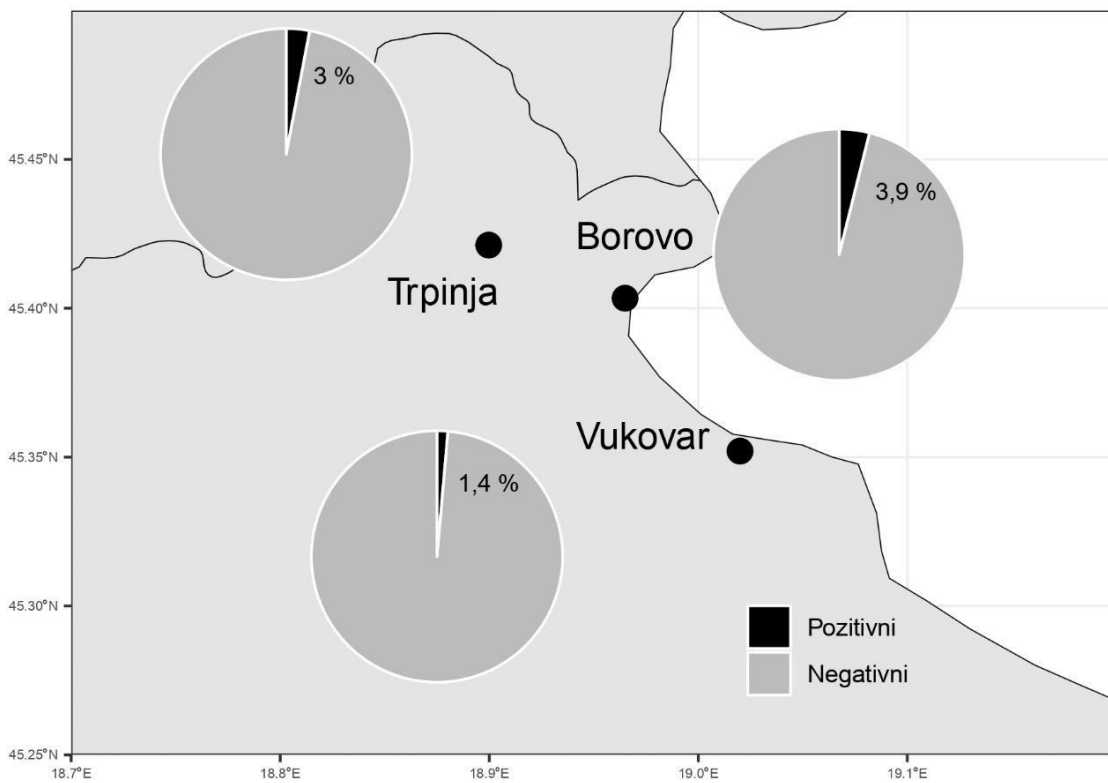
Tablica 2. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija flavivirusima

ČIMBENIK RIZIKA	OR	95 % CI	p
Spol	0,92	0,11 – 7,81	0,94
vodene površine	0,66	0,32 – 1,36	0,26
Šišanje	0,58	0,28 – 1,2	0,14
klinički znakovi	1,93	0,81 – 4,59	0,14
dob (godine)	1,08	0,94 – 1,23	0,26
veličina stada	0,999	0,995-1,002	0,5
udaljenost (km)	0,95	0,88 – 1,03	0,23
udaljenost od kućanstva (km)	1,92	1,27 – 2,9	0,002

OR – omjer izgleda

CI – interval pouzdanosti

Prilikom promatranja raspodjele pozitivnih ovaca na WNV s obzirom na lokaciju, utvrđeno je da je 3,9 % pozitivnih u općini Borovo, 3,0 % pozitivnih je na području općine Trpinja i 1,4 % pozitivnih je području grada Vukovara (Tablica 1, Slika 3). Nije utvrđen značajan utjecaj lokacije na prevalenciju infekcija WNV (ANOVA,  $p=0,54$ ). Promatrajući pasmine ovaca inficiranih WNV nije utvrđena statistički značajnat razlika u prevalenciji WNV (ANOVA,  $p=0,17$ ). Statistički značajan utjecaj nije utvrđen također niti za ostale čimbenike rizika (Tablica 3).



Slika 3. Prevalencija infekcije WNV na promatranim lokacijama

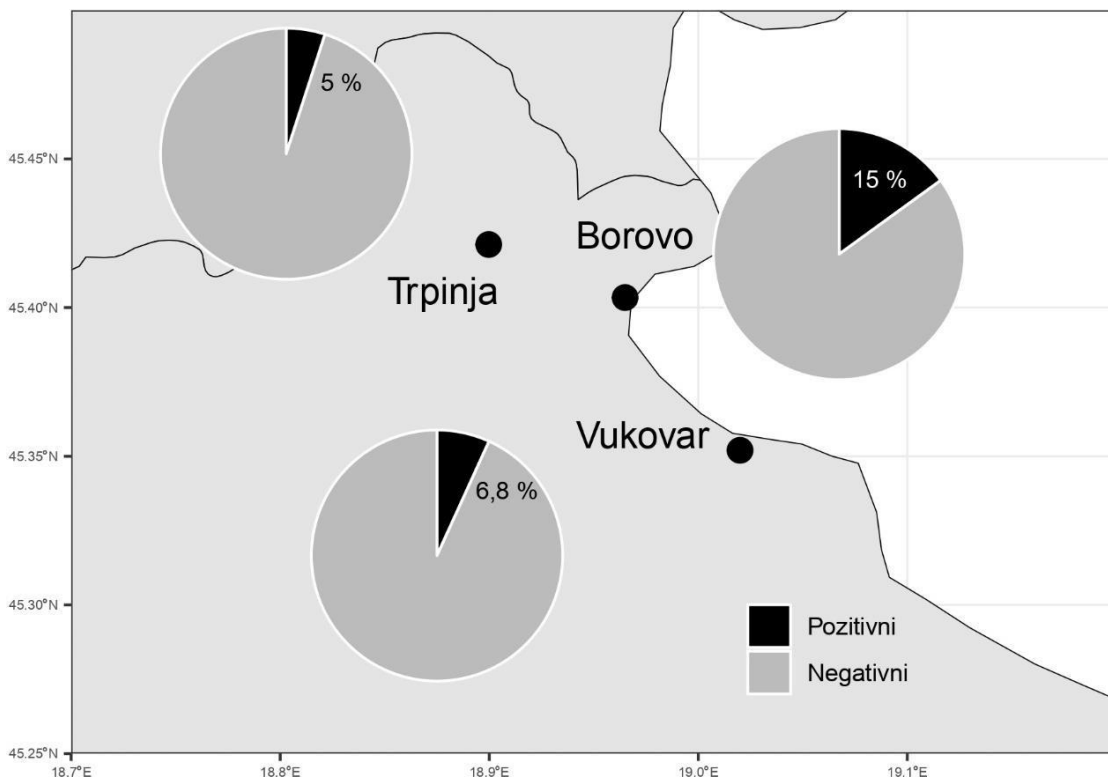
Tablica 3. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija WNV

ČIMBENIK RIZIKA	OR	95 % CI	p
Spol	1,97	0,1 – 37,04	0,65
vodene površine	0,27	0,03 – 2,18	0,22
Šišanje	1,01	0,25 – 4,13	0,99
klinički znakovi	1,06	0,13 – 8,8	0,95
dob (godine)	1,06	0,75 – 1,35	0,69
veličina stada	1,0004	0,99-1,01	0,91
udaljenost (km)	1,034	0,88-1,19	0,65
Udaljenost od kućanstva (km)	1,07	0,38-2,55	0,89

OR – omjer izgleda

CI – interval pouzdanosti

Prostorna raspodjela pozitivnih rezultata na TBEV je sljedeća: 15,0 % pozitivnih uzoraka je na području općine Borovo, 5,0 % pozitivnih na području općine Trpinja i 6,8 % pozitivnih je na području grada Vukovara (Tablica 1, Slika 4). Analizom udaljenosti stada od kućanstva utvrđeno je da je prosječna udaljenost kućanstva od ovaca na području općine Borovo 1,12 km, na području općine Trpinja 0,05 km, na području grada Vukovara 0,5 km. Statističkom analizom utvrđena je statistički značajan utjecaj lokacije u prevalenciji TBEV (ANOVA,  $p=0,03$ ). Detaljnijom analizom prikupljenih podataka, utvrđeno je da su ovce pasmine cigaja bile držane udaljene od kućanstava prosječno 1,7 km (raspon 1,5-2 km), dok su ostale pasmine bile držane uz kućanstva (romanovska prosječno 0,33 km, raspon 0,02-0,05 km; njemački merino 0,05 km). Analizom podataka utvrđena je značajna utjecaj pasmine u prevalenciji infekcija TBEV (ANOVA,  $p=0,0008$ ). Promatrajući pasmine ovaca inficirane TBEV utvrđeno je da pasmina cigaja ima 4,02 veću učestalost infekcije virusom TBEV od pasmine njemački merino (OR=4,02; 95 % CI=1,64-10,89;  $p=0,003$ ). Gledajući udaljenost kućanstva kao čimbenik rizika u prevalenciji TBE utvrđen je statistički značajan utjecaj (Tablica 3) tako da se većom udaljenošću povećava i vjerojatnost infekcija. Za ostale čimbenike rizika nije utvrđen značajan utjecaj u prevalenciji TBEV (Tablica 4).



Slika 4. Prevalencija infekcije TBEV na promatranim lokacijama

Tablica 4. Prikaz čimbenika rizika u prevalenciji infekcija TBE virusom

ČIMBENIK RIZIKA	OR	95 % CI	p
Spol	1,55	0,18 – 13,37	0,69
vodene površine	0,55	0,22 – 1,4	0,21
Šišanje	0,39	0,14 – 1,06	0,06
klinički znakovi	2,41	0,9 – 6,48	0,08
dob (godine)	1,07	0,89 – 1,24	0,44
veličina stada	0,998	0,99 – 1,002	0,4
udaljenost (km)	0,91	0,8 – 1,01	0,104
udaljenost od kućanstva (km)	2,5	1,52 – 4,18	0,0003

OR – omjer izgleda

CI – interval pouzdanosti

Infekcija Usutu virusom potvrđena je u četiri ovce, tri s područja grada Vukovara te jedna s područja općine Trpinja što je bio nedostatan uzorak za provođenje daljnjih statističkih analiza i donošenja zaključaka.

## 5. RASPRAVA

Područje Vukovarsko-srijemske županije i istok Republike Hrvatske uz granicu s Mađarskom i Srbijom dugi niz godina je područje s najvišom seroprevalencijom WNV u konja. U kontinuitetu visoke stope seroprevalencije WNV u konja na istoku RH mogle bi značiti da je to područje dio endemičnog područja WNV u Europi (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Provođenjem ELISA metode utvrđeno je 37 % pozitivnih uzoraka ovaca na WNV. Zbog velikog broja sumnjivih rezultata na ELISA pretrazi, a kasnije i dokazane niske podudarnost rezultata testova ( $\kappa=0,07$ ), konačnim rezultatom smatrani su rezultati pretraživanja VN-testom uzoraka sumnjivih i pozitivnih ELISA-om, prema kojima je seroprevalencija WNV 3,0 %, TBEV 9,7 %, a USUV 1,3 %. U četiri (1,3 %) pretražena uzoraka VN-testom bilo je križnih reakcija te nije bilo moguće odrediti uzročnika. Iz navedenoga proizlazi da je od sveukupno 220 uzoraka pozitivnih ili sumnjivih pretraživanjem ELISA metodom VN-testom potvrđeno pozitivnim bilo 46 (20,1 %) na bilo koji flavivirus, odnosno samo 4,1 % ih je bilo pozitivno na WNV. Ovakav veliki broj lažno pozitivnih i sumnjivih rezultata pokazuje nisku specifičnost ELISA-e koja nije primjenjiva u serološkoj dijagnostici WNV u ovaca, niti u dijagnostici infekcija drugim flavivirusima, nego je potrebno sve uzorke pretraživati VN-testom.

Sveukupna seroprevalencija WNV na sve tri lokacije od 3,0 % nešto je niža od seroprevalencije WNV u jedinom donekle usporedivom istraživanju u Egiptu gdje je iznosila 3,5 % (SELIM i ABDELHADY, 2022.). S druge strane ona je višestruko niža nego u konja na istom području što je u skladu s opće prihvaćenom tezom da su konji osjetljiviji kao sentinel životinje za cirkulaciju WNV-a (STEJSKALOVA i sur., 2019.). Međutim, u endemskim područjima, kakvo je i Vukovarsko-srijemska županija, gdje vrlo visoka seroprevalencija u konja otežava praćenje novih infekcija i kroz to virusne aktivnosti, praćenje preko životinja manje osjetljivosti, kakvim su se pokazale ovce, je možda i bolji način.

Isključujući križne reakcije provedbom VN-testa, u ovom istraživanju je potvrđena kocirkulacija sva tri flavirusa prisutna na području RH i na području Vukovarsko-srijemske županije. Štoviše na dvije od tri lokacije je potvrđena kocirkulacija sva tri virusa, a samo na području Borova nisu dokazane infekcije USUV.

Od navedenih uzročnika na sve tri lokacije TBEV je imao najveću seroprevalenciju, koja je i statistički značajno veća na području općine Borovo, kao i općenito u Vukovarsko-srijemske županije. Ovo posebno zabrinjava jer je poznato i opisano da domaći preživači inficirani TBEV



možu uzročnika izlučivati mlijekom koje, ako se konzumira toplinski neobrađeno, može uzrokovati i oboljenja ljudi (ILIĆ i sur., 2020.). Ovakva seroprevalencija ukazuje i na nužnost uspostave sustava nadzora TBEV u ovaca čije mlijeko se stavlja na tržište u svrhu zaštite zdravlja ljudi.

Dokaz infekcija USUV na dvije istraživane lokacije je drugi dokaz infekcija domaćih životinja ovim zoonotskim uzročnikom na području RH s obzirom da je do sada opisana samo infekcija u konja (BARBIĆ i sur., 2013.). Štoviše, prema dostupnoj literaturi i do sada poznatim životinjskim vrstama u kojih su dokazane infekcije USUV (VILIBIĆ-CAVLEK i sur., 2020.), ovo je prvi dokaz infekcija ovaca ovim virusom. Stoga je potrebno nastaviti istraživanja kako bi pojasnili značaj USUV infekcija u ovaca.

Provođenjem statističke analize utvrđeno je da u prevalenciji flavivirusa bitnu ulogu igra udaljenost kućanstva od mjesta držanja ovaca te sama pasmina ovce. Prema uzročnicima, u prevalenciji WNV nije zabilježen statistički značajan utjecaj niti jednog istraživanog čimbenika rizika. Za razliku od toga, u seroprevalenciji TBEV utvrđeno je da lokacija, pasmina ovce i udaljenost kućanstva od ovce imaju značajan utjecaj na vjerojatnost infekcije. Međutim, daljnjom analizom rezultata je utvrđeno da su sve ovce pasmine cigaja bile držane na 1,5 – 2,0 km udaljenosti od kućanstva, dok su ostale dvije pasmine držane do najveće udaljenosti od 0,05 km. Posljedično, proizlazi da pasmina kao takva nije imala utjecaj na mogućnost infekcije TBEV, nego sama udaljenost od kućanstva. S obzirom na prirodni ciklus TBEV koji uključuje prijenos krpeljima (ILIĆ i sur., 2020.) ovaj rezultat veće vjerojatnosti za infekciju TBEV na većoj udaljenosti stada od kućanstva je objašnjiv činjenicom da se oko kućanstva uređuje okućnica i s time smanjuje prirodno stanište krpelja. Kako je dodatnom analizom podataka ustanovljeno da je sama lokacija izravno povezana s udaljenošću od kućanstva, jer su ovce na području općine Borovo bile udaljene od 0,02 do 2,00 km (prosječno 1,12 km), a na ostale dvije lokacije su bile najviše udaljene do 0,5 km, smatramo da je od analiziranih čimbenika rizika jedini stvarni utjecaj na prevalenciju TBEV u ovaca na području Vukovarsko-srijemske županije imala udaljenost od kućanstva.

Sveukupno dokazane infekcije ovaca s područja Vukovarsko-Srijemske županije sa sva tri virusa prisutna na području RH potvrđuju njihovu vrijednost kao sentinel životinja u praćenju proširenosti i aktivnosti svih flavivirusa. Njihova široka geografska distribucija i sve veći broj, kao i kretanje na malom geografskom prostoru, naglašavaju im vrijednost kao sentinel životinjama. Ovo je dodatno naglašeno i dokazom visoke seroprevalencije infekcija TBEV pri čemu su ovce ne samo indikatori prisustva i aktivnosti virusa na nekom području nego i

potencijalni izvori infekcije za ljude izlučujući virus mlijekom. Uz sve navedeno prvi dokaz USUV infekcije ovaca potiče na nastavak istraživanja.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ovce se mogu koristiti kao sentinel životinje za praćenje virusa Zapadnog Nila kao i drugih flavivirusnih infekcija.
2. ELISA metoda nije pouzdana u rutinskoj dijagnostici zbog nedostatne specifičnosti i dokazanih križnih reakcija.
3. Pretraživanjem ovaca dokazana je kocirkulacija WNV, TBEV i USUV na području Vukovarsko-srijemske županije, što predstavlja i prvi dokaz infekcija USUV u ovaca.
4. Učestalost infekcija pojedinim flavivirusima razlikuje se po lokacijama s najvećom učestalošću infekcija TBEV na sve tri lokacije.
5. Od čimbenika rizika najveći utjecaj ima udaljenost mjesta držanja ovaca od kućanstva gdje se povećanjem udaljenosti povećava šansu za infekcije ovaca TBEV.

## 7. LITERATURA

1. ABADIE KEMMERLY, S., (2003): Diagnosis and Treatment of West Nile Infections. *Summ. Autum.* 5, 16-17.
2. ANONYMUS (2021): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2022. godini. NN 145/2021, Zagreb, Hrvatska
3. BARBIĆ, LJ., E. LISTEŠ, S. KATIĆ, V. STEVANOVIĆ, J. MADIĆ, V. STAREŠINA, A. LABROVIĆ, A. DI GENNARO, G. SAVINI (2012): Spreading of West Nile infection in Croatia. *Vet. Microbiol.* 159, 504-508. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.038
4. BARBIC, LJ., T. VILIBIC-CAVLEK, E. LISTES, V. STEVANOVIC, I. GJENERO-MARGAN, S. LJUBIN-STERNAK, I. PEM-NOVOSEL, I. LISTES, G. MLINARIC-GALINOVIC, A. DI GENNARO, G. SAVINI (2013): Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13, 772–774. doi:10.1089/vbz.2012.1236.
5. BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, Z. MILAS, V. STAREŠINA, N. TURK, Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, J. HABUŠ, M. PERHAIC, S. MARTINKOVIĆ, K. MOJČEC PERKO, V. MADIĆ, J. LOHMAN JANKOVIĆ, I. MALTAR (2014): Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj – značaj i rezultati veterinarske kontrole u javnom zdravstvu. *Hrvat. Vet. Vjes.* 22, 24-31.
6. BLITVICH, B. J. (2008): Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Animal Heal. Res.* 9, 71-86. doi: 10.1017/S1466252307001430
7. COLPITTS, T., M. M. J. CONWAY, R. R. MONTGOMERY, E.,4 FIKRIG (2012): West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 635. doi: 10.1128/CMR.00045-12.
8. DEEKS, J. J., J. P. T. HIGGINS (2010): Statistical algorithms in Review Manager 5. Dostupno na mrežnoj stranici <https://training.cochrane.org/>, pristup dana 5. veljače 2023. godine.
9. GARCIA-BOCANEGRA, I., A. ARENAS-MONTES, S. NAPP, J. A. JAEN-TELLEZ, M. FERNANDEZ-MORENTE, V. FERNANDEZ-MOLERA, A. ARENAS (2012):

- Seroprevalence and risk factors associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain. *Vet. Microb.* 160, 341-346.  
doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.027
10. HAPIH (2021.a): Godišnje izvješće za 2021. godinu – Kopitari. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, Hrvatska.
11. HAPIH (2021.b): Godišnje izvješće za 2021. godinu – Ovčarstvo, kozarstvo i male životnje. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, Hrvatska.
12. HENDERSON LAWRIE, C., N. YUMARI UZCATEGUI, E. ANDREW GOULD, P. ANNE NUTTALL (2004): Ixodid and Argasid tick species and West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 653-657.  
doi: 10.3201/eid1004.030517
13. HERNÁNDEZ-JOVER, M., S. ROCHE, M. P. WARD (2013): The human and animal health impacts of introduction and spread of an exotic strain of West Nile virus in Australia. *Preventive Vet. Med.* 109, 186-204.  
doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.09.018
14. ILIC, M., LJ. BARBIC, M. BOGDANIC, I. TABAIN, V. SAVIC, M. L. KOSANOVIC LICINA, B. KAIC, A. JUNGIC, M. VUCELJA, V. ANGELOV, M. KOVACEVIC, D. RONCEVIC, S. KNEZEVIC, V. STEVANOVIC, I. SLAVULJICA, D. LAKOSELJAC, N. VICKOVIC, M. BUBONJA-SONJE, L. HANSEN, T. VILIBIC-CAVLEK (2020): Tick-borne encephalitis outbreak following raw goat milk consumption in a new micro location, Croatia, June 2019. *Tick and Tick-borne Dis.* 11, 101513.  
doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101513
15. KLOBUCAR, A., V. SAVIC, M. CURMAN POSAVEC, S. PETRINIC, U. KUCHAR, I. TOPLAK, J. MADIC, T. VILIBIC-CAVLEK (2021): Screening of Mosquitoes for West Nile Virus and Usutu Virus in Croatia, 2015-2020. *Trop. Med. Infect. Dis.* 6, 45. doi: 10.3390/tropicalmed6020045
16. KOMAR, N., (2006): West Nile Virus Surveillance using Sentinel Birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951, 58-73.  
doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02685.x
17. LANDIS, J. R., G. G. KOCH (1977): The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.  
doi: 10.2307/2529310
18. MURRAY, K., O., C. WALKER, E. GOULD (2011): The virology, epidemiology, and

clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. *Epidemiol. Infect.* (2011), 139, 807-817, doi: 10.1017/S0950268811000185

19. PAGANO, M., K. GAUVREAU (2018.): Principles of biostatistics. 2nd ed., Chapman and Hall/CRC, New York.
20. PEM-NOVOSEL, I., T. VILIBIC-CAVLEK, I. GJENERO-MARGAN, N. PANDAK, L. PERIC, LJ. BARBIC, E. LISTES, A. CVITKOVIC, V. STEVANOVIC, G. SAVINI (2014): First outbreak of West Nile Virus Neuroinvasive Disease in Humans, Croatia, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 82-84 .  
doi: 10.1089/vbz.2012.1295
21. PETROVIĆ, T., M. ŠEKLER, D. PETRIĆ, S. LAZIĆ, Z. DEBELJAK, D. VIDANOVIĆ, A. IGNJATOVIĆ ČUPINA, G. LAZIĆ, D. LUPULOVIĆ, M. KOLAREVIĆ, B. PLAVŠIĆ (2018): Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. *PloS ONE* 13, e0195439.  
doi: 10.1371/journal.pone.0195439
22. R CORE TEAM (2022): R - A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
23. SANTINI, M., T. VILIBIC-CAVLEK, B. BARSIC, LJ. BARBIC, V. SAVIC, V. STEVANOVIC, E. LISTES, A. DI GENNARO, G. SAVINI (2015): First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August-September 2013: clinical and laboratory features. *J. Neurovirol.* 21, 92-97.  
doi: 10.1007/s13365-014-0300-4
24. SELIM, A., A. ABDELHADY (2020): The first detection of anti-West Nile virus antibody in domestic ruminants in Egypt. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 3147-3151. doi: 10.1007/s11250-020-02339-x
25. SHESKIN, D. J. (2004): Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures. 3rd ed., Chapman & Hall/CRC, New York,
26. STEJSKALOVA, K., M. CVANOVA, J. OPPELT, E. JANOVA, C. HORECKY, E. HORECKA, A. KNOLL, A. LEBLOND, P. HORIN (2019): Genetic susceptibility to West Nile virus infection in Camargue horses. *Res. Vet. Scien.* 124, 284-292.  
doi: 10.1016/j.rvsc.2019.04.004
27. VILIBIC-CAVLEK, T., B. KAIC, L. BARBIC, I. PEM-NOVOSEL, V. SLAVIC-VRZIC, V. LESNIKAR, S. KURECIC-FILIPOVIC, A. BABIC-ERCEG, V. STEVANOVIC, I. GJENERO-MARGAN, G. SAVINI (2014): First evidence of

simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infect.* 42, 689-695.

doi: 10.1007/s15010-014-0625-1

28. VILIBIC-CAVLEK, T., V. SAVIC, D. SABADI, LJ. PERIC, L. BARBIC, A. KLOBUCAR, B. MIKLAUSIC, I. TABAIN, M. SANTINI, M. VUCELJA, E. DVORSKI, T. BUTIGAN, G. KOLARIC-SVIBEN, T. POTOČNIK-HUNJADI, M. BALENOVIC, M. BOGDANIC, Z. ANDRIC, V. STEVANOVIĆ, K. ČAPAK, M. BALICEVIĆ, E. LISTES, G. SAVINI (2019): Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the 'One health' context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1946-1957.  
doi: 10.1111/tbed.13225
29. VILIBIC-CAVLEK, T., T. PETROVIC, V. SAVIC, L. BARBIC, I. TABAIN, V. STEVANOVIĆ, A. KLOBUCAR, A. MRZLJAK, M. ILIĆ, M. BOGDANIC, I. BENVIN, M. SANTINI, K. ČAPAK, F. MONACO, E. LISTES, G. SAVINI (2020): Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* 9, 699. doi: 10.3390/pathogens9090699
30. VILIBIC-CAVLEK, T., V. SAVIC, A. KLOBUCAR, T. FERENC, M. ILIĆ, M. BOGDANIC, I. TABAIN, V. STEVANOVIĆ, M. SANTINI, M. CURMAN POSAVEC, S. PETRINIĆ, I. BENVIN, I. FERENČAK, V. ROZAC, L. BARBIC (2021.a): Emerging Trends in the West Nile Virus Epidemiology in Croatia in the 'One health' Context, 2011-2020. *Trop. Med. Infect. Dis.* 6, 140.  
doi: 10.3390/tropicalmed6030140
31. VILIBIC-CAVLEK, T., L. BARBIC, A. MRZLJAK, D. BRNIC, A. KLOBUCAR, M. ILIĆ, N. JANEV-HOLCER, M. BOGDANIC, L. JEMERSIĆ, V. STEVANOVIĆ, I. TABAIN, S. KRČMAR, M. VUCELJA, J. PRPIĆ, M. BOLJFETIĆ, P. JELIĆIĆ, J. MADIĆ, I. FERENČAK, V. SAVIC (2021.b): Emerging and Neglected Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. *Pathogens* 10, 73.  
doi: 10.3390/pathogens10010073
32. WOAHP (2018): West Nile Fever, Terrestrial Manual - chapter 2.1.24. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

## 8. SAŽETAK

### Mašović, V.: Ovce kao sentinel životinje u bolesti Zapadnog Nila

Virus Zapadnog Nila (WNV) je emergentni zoonotski uzročnik koji na području RH posljednjih desetak godina uzrokuje oboljenja ljudi od kojih su neka i sa smrtnim ishodom. Zbog toga se kontinuirano provodi sustav nadzora virusne aktivnosti korištenjem konja i peradi kao sentinel životinja. Kako bi istražili mogućnost unaprjeđenja sustava nadzora, u ovom radu smo istražili mogućnost korištenja ovaca kao sentinel životinja. U tu svrhu 300 seruma ovaca s područja Vukovarsko-rijemske županije pretražili smo imunoenzimnim testom (ELISA) te sve s pozitivnim ili sumnjivim rezultatom dodatno potvrdnim virus neutralizacijskim testom (VN-testom) uz korištenje tri flavivirusa koja cirkuliraju na području RH. Rezultati su pokazali da je ELISA test nedostatan specifičan za rutinsku dijagnostiku, a VN-testom su potvrđene infekcije ovaca WNV, virusom krpeljnog encefalitisa (TBEV) i po prvi put uopće infekcije ovaca usutu virusom (USUV). Potvrđena je kocirkulacija sva tri virusa na istom prostoru uz najvišu seroprevalenciju infekcija TBEV koja je sveukupno iznosila 9,7 % uz razlike po lokacijama od 5,0 % do 15,0 %. Ovaj rezultat dodatno zabrinjava jer ovce mogu TBEV izlučivati mlijekom zbog kojega može doći do oboljenja ljudi. Seroprevalencija WNV je 3,0%, a najniža seroprevalencije je bila USUV (1,3 %). Uz to potvrđene su i križne reakcije ili moguće istovremene infekcije različitim flavivirusima u 1,3 % životinja. Analizirani su i čimbenici rizika te je dokazano da je udaljenost mjesta držanja ovaca od kućanstva proporcionalna povećanju vjerojatnosti od infekcije TBEV. Sveukupno istraživanjem je potvrđeno da ovce mogu biti sentinel životinje za flavivirusne infekcije te da se pretraživanjem ovaca VN-testom kao metodom izbora, može nadzirati prisustvo i aktivnost WNV, TBEV, ali i USUV što je dokazano po prvi put.

**Ključne riječi:** WNV, TBEV, USUV, sentinel životinje, ovce,



## 9. SUMMARY

### Mašović, V.: Sheep as sentinel animal for West Nile disease

In the last decade, the West Nile virus (WNV) is an emerging zoonotic disease in Croatia, causing illness and fatalities in people. The surveillance of viral activity is continuously implemented using horses and poultry as sentinel animals. This study aimed to investigate sheep as the possible sentinel animals in the surveillance program of WNV. The study was conducted on sheep sera from Vukovarsko-srijemska County in May 2022. In total, 300 sheep sera were tested using the ELISA test. Additionally, all positive and suspicious ELISA results were examined with VN-test using all three flaviviruses circulating in Croatia. The results revealed that ELISA is insufficiently specific for routine diagnostics. On the other hand, VN-test confirmed cases of WNV, TBEV and, for the first time, USUV infection in sheep. TBEV had the highest seroprevalence (9.7 %), ranging from 5.0 % - 15.0 % between locations. This result is concerning because TBEV can be found in sheep milk, which can be a source of human infection. WNV seroprevalence was 3.0 %, and USUV had the lowest seroprevalence (1.3 %). In addition, cross-reactions or possible simultaneous infections with different flaviviruses were confirmed in 1.3 % of animals. Risk factors analysis revealed that the distance of sheep habitat from houses is proportional to the probability of infection with TBEV. Overall, this research confirmed that sheep could be used as sentinel animals in flavivirus surveillance programs. They could detect the presence and activity of WNV, TBEV, and USUV with a VN-test as a diagnostic method of choice.

**Key words:** WNV, TBEV, USUV, sentinel, sheep

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 23. veljače 1999. godine u Zagrebu gdje sam završio osnovnu školu Bartola Kašića. Nakon osnovne škole upisujem I. opću gimnaziju u Zagrebu. Veterinarski fakultet upisujem nakon završene srednje škole 2017. godine. Tijekom studiranja na Veterinarskom fakultet sudjelujem kao volonter na klinikama fakulteta. Dodatno, kao volonter provodim ljeto 2021. godine u Veterinarskoj stanici Vukovar, a ljeto 2022. godine u Veterinarskoj ambulanti Karaula. Aktivno sudjelujem na veterinarskim kongresima i seminarima tijekom studija.