

# Prevalencija neutralizacijskih protutijela za Bandavirus bhanjanagarensis u pasa i mačaka zaprimljenih na Klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

---

Kovačić-Gregov, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:772366>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ  
*VETERINARSKA MEDICINA*

Elena Kovačić- Gregov

Prevalencija neutralizacijskih protutijela za *Bandavirus bhanjanagarensis* u pasa  
i mačaka zaprimljenih na Klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2024.

Elena Kovačić- Gregov

ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
3. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. prof. dr. sc. Vilim Starešina (zamjena)

Rad sadržava 53 stranice, 13 slika, 5 tablica, 37 literaturnih navoda.

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću, mom mentoru, na velikoj podršci i dragocjenim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Njegovo veliko znanje, iskustvo i ljubazne riječi bili su neprocjenjivi ne samo u izradi rada, već i tijekom pripreme za ispit iz zaraznih bolesti.*

*Zahvaljujem se Gorani Miletić, dr. med. vet., na nesebičnoj podršci i spremnosti da pomogne u svakom trenutku. Njeni smireni pristup, korisni savjeti i jasne smjernice olakšali su mi rad i razjasnili mnoge nedoumice. Njena pomoć bila je neizmjereno vrijedna za uspješan završetak ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Snježani Kovač na iznimno ugodnom radu u laboratoriju. Njena smirenost, tople riječi i vedar duh, uz ogromno znanje, učinili su to razdoblje ne samo lakšim, nego i radosnijim. Njena podrška i pozitivnost uvelike su doprinijele mom iskustvu tijekom rada na diplomskom.*

*Želim iskreno zahvaliti svim djelatnicima Virološkog laboratorija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Klinike za zarazne bolesti na nesebičnom dijeljenju svog znanja i vještina tijekom rada na diplomskom.*

*Zahvalna sam na svojoj obitelji, dečku i prijateljima jer su mi uvijek pružali podršku. Nikada nisam bila sama u teškim trenucima, uvijek sam imala nekoga tko bi me ohrabrio. Od srca vam hvala, bez vas ovo ne bi bilo moguće.*

*Zahvalna sam na svojim psima, Hadu i Belli, koji su proveli sate i sate sjedeći pokraj mene dok sam učila. Njihova tiha podrška je bila neprocjenjiva motivacija za završetak studija.*

## POPIS KRATICA

A/U - adenin/uracil bogata petlja

BHAV - *Bandavirus bhanjanagarensis*

CDC - Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*)

CO<sub>2</sub> - ugljični dioksid

CPU - citopatogeni učinak

DMEM - Dulbeccov modificirani medij Eagle (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

EFSA - Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *The European Food Safety Authority*)

FCS - goveđi fetalni serum (engl. *Fetal calf serum*)

FORV- *Forécariah* virus

Gc - glikoprotein c

Gn - glikoprotein n

HI - hemaglutinacijski-inhibirajuća protutijela

ICTV - Međunarodno vijeće za taksonomiju virusa (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

i.c. - intracerebralno

i.n. - intranazalno

i.p. - intraperitonealno

i.v. - intravenski

L - veliki (engl. *Large*)

M - srednji (engl. *Medium*)

MalV- *Malsoor* virus

mRNK - glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *Messenger RNA*)

N - nukleokapsidni protein

NS - nestrukturani proteini (engl. *Nonstructural proteins*)

NSs - nestrukturani mali proteini (engl. *Nonstructural small proteins*)

NT - neutralizirajuća protutijela

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

ORF - otvoreni okviri za čitanje (engl. *Open Reading Frames*)

p - vrijednost - razina značajnosti

PALV- *Palma* virus

p.o. - peroralno

RdRp - RNK-ovisna RNK polimeraza (engl. *RNA-dependent RNA polymerase*)

RNAi - RNK interferencija (engl. *RNA interference*)

RNK - ribonukleinska kiselina

s.c. - supkutano

S - mali (engl. *Small*)

SVD - standardna virusna doza

VN - virus neutralizacijski test

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

$\chi^2$  - hi kvadrat

95% CI -interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

## POPIS PRILOGA

### SLIKE:

Slika 1. Strategije kodiranja genskih segmenata članova razreda *Bunyaviricetes*.

Slika 2. Shematski prikaz terminalnih konzerviranih komplementarnih sekvenci genoma *Bandavirus bhanjanagarensis* (BHAV)

Slika 3. Organizacija genoma *Bandavirusa*.

Slika 4. Predviđena sekundarna struktura međugenske regije između dva okvira za čitanje (ORF) u S segmentu RNK *Bandavirus bhanjanagarensis*.

Slika 5. Rasprostranjenost *Bandavirus bhanjanagarensis*.

Slika 6. Geografska distribucija pacijenata sa neurološkim simptomima nepoznate etiologije koji su seropozitivni na BHAV.

Slika 7. Radni obrazac korišten za izvođenje i evidenciju VN-testa za BHAV virus.

Slika 8. Radni obrazac za izračun titra virusa po Reed-Muench-ovoj metodi i izračun razrjeđenja virusa za pripremu standardne virusne doze.

Slika 9. Prikaz početne mikrotitracijske plitice screening testa.

Slika 10. Prikazan je daljnji postupak razrjeđivanja seruma u kojem su screening testom utvrđena protutijela na virus, zajedno s postignutim razrjeđenjima seruma u pojedinim redovima.

Slika 11. Prikaz sloja E6 Vero stanica.

Slika 12. Izražen citopatogeni učinak virusa BHAV-1.

Slika 13. Usporedba seroprevalencije između mužjaka i ženki psa.

TABLICE:

Tablica 1. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa i mačaka.

Tablica 2. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa po dobnim kategorijama.

Tablica 3. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti između čistokrvnih pasa i križanaca.

Tablica 4. Značajke uzorka mačaka u istraživanju.

Tablica 5. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa s područja županije Grada Zagreba i ostalih dijelova Republike Hrvatske.



## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	3
2.1. Povijest .....	3
2.2. Etiologija .....	4
2.2.1. Građa virusne čestice.....	4
2.2.2. Građa genoma.....	6
2.3. Taksonomija i klasifikacija .....	8
2.4. Tenacitet .....	9
2.5. Proširenost.....	9
2.6. Epizootiologija .....	12
2.7. Patogeneza.....	12
2.8. Klinička slika.....	13
2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz .....	14
2.10. Dijagnostika .....	14
2.11. Liječenje .....	15
2.12. Profilaksa i imunoprofilaksa .....	15
2.13. Javno zdravstvo .....	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	18
3.1. Odabir uzorka .....	18
3.2. Prikupljanje podataka .....	18
3.3. Dokaz prisutnosti protutijela za <i>Bandavirus</i> .....	18
3.4. Opis postupka.....	19
3.4.1. Materijali .....	19
3.4.2. Izvođenje postupka.....	24
3.5. Statistička obrada podataka .....	28
<b>4. REZULTATI</b> .....	29
<b>5. RASPRAVA</b> .....	34
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	38
<b>7. LITERATURA</b> .....	39
<b>8. SAŽETAK</b> .....	43
<b>9. SUMMARY</b> .....	44
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	45

## 1. UVOD

*Bandavirus bhanjanagarensis* (BHAV) je transmisivni patogen koji pripada razredu *Bunyaviricetes* i poznat je po svojoj sposobnosti inficiranja širokog spektra domaćih i divljih životinja, uključujući goveda, ovce, koze, kao i razne druge vrste sisavaca. *Bandavirus bhanjanagarensis* je virus kojeg prenose krpelji, prvi put otkriven u krpelju (*Haemaphysalis intermedia*) uzorkovanom s paralizirane koze u Bhanjanagaru, Indija, 1954. godine (HUBÁLEK, 2010.). Infekcija u ljudi je prvi put dokumentirana 1974. godine kada je Charles Calisher radio s virusom u laboratoriju i sam se zarazio (CALISHER i GOODPASTURE, 1975.). Njegovo iskustvo bilo je blago i uključivalo je simptome blage boli u mišićima i zglobovima, umjerenu glavobolju i blagu fotofobiju.

U svjetlu globalnih klimatskih promjena i povećane mobilnosti ljudi i životinja, zoonotske bolesti predstavljaju sve veći javnozdravstveni izazov. Nedavno istraživanje objavljeno u časopisu *Microorganisms* (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.) pod naslovom "*Detection of Bhanja Bandavirus in Patients with Neuroinvasive Disease of Unknown Etiology in Croatia*" pokazalo je prisutnost neutralizacijskih protutijela na *Bandavirus* u populaciji ljudi Hrvatske. Iako su klinički znakovi infekcije BHAV-om u ljudi rijetki i uglavnom blagi, virus može uzrokovati ozbiljnije zdravstvene probleme kod nekih životinjskih vrsta. Preživači su životinje u kojih je oboljenje najčešće zabilježeno. Od blagog infektivnog sindroma u odraslih i imunokompetentnih jedinki do težeg oblika bolesti s neurološkim znakovima u mladim i životinja s komorbiditetima (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.). Potvrda prisutnosti *Bandavirusa* među ljudima u Hrvatskoj i opis bolesti u nekim životinjski vrsta naglašavaju potrebu za dodatnim istraživanjem širenja virusa i njegovog utjecaja na zdravlje ljudi i životinja. Istraživanje prevalencije neutralizacijskih protutijela za *Bandavirus* u populaciji domaćih životinja, kao što su psi i mačke, postaje stoga prilika za razumijevanje širenja ovog virusa i njegovog potencijalnog utjecaja na javno zdravlje, ali i veterinarsku praksu. Ovaj diplomski rad usmjeren je na istraživanje prevalencije neutralizacijskih protutijela za *Bandavirus* u pasa i mačaka zaprimljenih na klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Epizootiološka i epidemiološka značajka urbanih područja je visoka gustoća populacije, kako ljudi tako i životinja, što može znatno ubrzati širenje infekcija (EDER i sur., 2018.). Prisutnost psa ili mačke s protutijelima na BHAV u urbanom području može ukazivati na postojanje virusa i

rizika od infekcije, kako u životinja, tako i u ljudi. Razumijevanje dinamike prenošenja BHAV-a, posebice u urbanim sredinama, gdje su psi i mačke često u bliskom kontaktu s velikim brojem drugih životinja i ljudi, može postati ključno za efikasno planiranje javnozdravstvenih mjera i unapređenje veterinarskih praksi.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Povijest

*Bandavirus bhanjanagarensis*, prema Međunarodnom vijeću za taksonomiju virusa (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*), spada u skupinu *bunyavirusa* koje prenose krpelji, a pripada obitelji *Phenuiviridae*, rod *Bandavirus*. Ovaj virus prvi je put izoliran 1954. godine iz krpelja vrste *Haemaphysalis intermedia*, koji je prikupljen s paralizirane kože u Bhanjanagaru, Indija (SHAH i WORK, 1969.). Prvi zabilježeni slučaj infekcije kod čovjeka datira iz 1974. godine (HUBÁLEK, 2010.), kada je laboratorijski radnik razvio blagu febrilnu bolest koja se očitovala simptomima poput blage groznice, bolova u mišićima i zglobovima, glavobolje i fotofobije koja je trajala 48 sati. Virus je izoliran iz njegove krvi, a u konvalescentnom uzorku seruma zabilježeno je značajno povećanje titra neutralizirajućih (NT) protutijela (CALISHER i GOODPASTURE, 1975.). Iako je BHAV prisutan na širokom geografskom području koje obuhvaća središnju Europu, Mediteran, Bliski istok, Indiju i Afriku, zabilježeni klinički slučajevi kod ljudi su rijetki (DILCHER i ALVES, 2012.). Ovce, koze, goveda, afrički ježevi (*Atelerix albiventris*) i afričke zemljane vjeverice (*Xerus erythropus*) prepoznati su kao domaćini BHAV-a. Iako odrasle životinje rijetko pokazuju kliničke znakove, mladi preživaci mogu razviti groznicu i kliničke znakove neurološkog oboljenja. Vektori BHAV-a uključuju krpelje iz rodova *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* i *Amblyomma*, pri čemu su *Haemaphysalis* krpelji glavni vektori u Europi (HUBÁLEK, 2010.). U Europi i Sjevernoj Africi zabilježeno je osam vrsta krpelja iz roda *Haemaphysalis*, od kojih je šest prisutno u Hrvatskoj (KRČMAR, 2012.; ESTRADA-PEÑA i sur., 2017.).

U Hrvatskoj je BHAV prvi put izoliran 1974. godine iz krpelja vrste *Haemaphysalis punctata*, prikupljenih s ovaca na otoku Braču (VESENJAK- HIRJAN i sur., 1980.). Prvi slučaj infekcije BHAV-om kod čovjeka u Hrvatskoj zabilježen je 1974. godine u laboratorijskim uvjetima, a do 1977. godine prijavljena su još dva takva slučaja (PUNDA i sur., 1980.). Nakon što je BHAV retrospektivno dijagnosticiran u Zagrebu kod pacijenta sa simptomima meningoencefalitisa i spastičkom kvadriparezom, zoonotski potencijal ovog

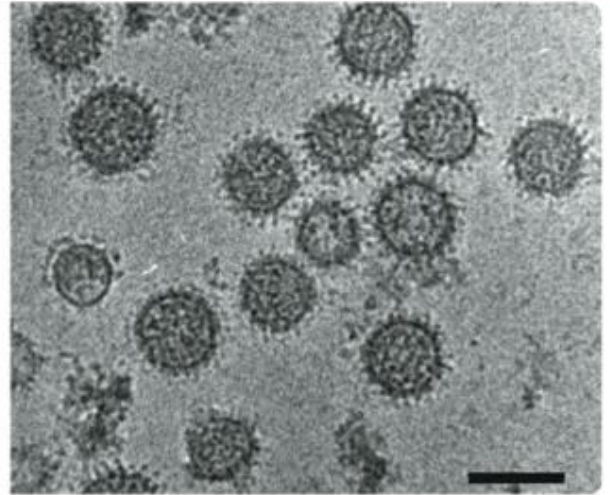
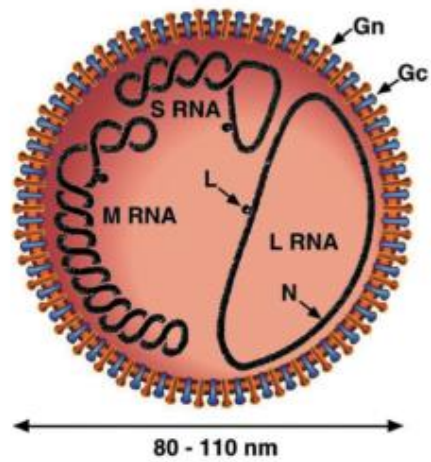
virusa postao je evidentan 1975. godine. Pacijent, koji je tri tjedna prije početka bolesti boravio u sjevernoj Hrvatskoj, razvio je simptome meningoencefalitisa u prosincu, u regiji gdje su također pronađeni krpelji *H. punctata*. Seroepidemiološka istraživanja provedena nakon izolacije virusa u Hrvatskoj otkrila su prisutnost BHAV hemaglutinacijski-inhibirajućih (HI) protutijela u 31,5% stanovnika otoka Brača tijekom 1975. i 1977. godine. U drugom istraživanju iz 1975. godine, BHAV neutralizirajuća protutijela otkrivena su u 35,8% (od 11,6% do 61,3%) stanovnika iz osam sela na otoku Braču. Dodatno, HI protutijela pronađena su u 2,2% stanovnika otoka oko Zadra (Srednja Dalmacija) i 1% stanovnika otoka Hvara, kao i u 7,1% stanovnika sjeverne Hrvatske (VESENJAK- HIRJAN i sur., 1991.). Međutim, noviji podaci o prevalenciji BHAV-a u Hrvatskoj trenutno nisu dostupni.

## 2.2. Etiologija

### 2.2.1. Građa virusne čestice

Razred *Bunyaviricetes*, su najveća i jedna od najraznolikijih skupina ribonukleinskih (RNK) virusa. Virusne čestice iz razreda *Bunyaviricetes* (prije poznatog kao obitelj *Bunyaviridae*) su okruglastog oblika i promjera od 80 do 120 nm. Na njihovom lipidnom dvoslojnom omotaču, debljine oko 5 nm, nalaze se glikoproteinske izbočine veličine od 5 do 10 nm. Omotač viriona najčešće nastaje iz Golgijevih membrana unutar stanica domaćina, a povremeno i iz membrana na površini tih stanica. Ribonukleokapsidi virusa imaju promjer od 2 do 2,5 nm i duljinu od 200 do 3000 nm, te često pokazuju helikalnu simetriju. Ovi virusi imaju zajedničku genetsku organizaciju u tri segmentirane negativne RNK označeni kao mali (engl. *small*- S), srednji (engl. *medium*- M) i veliki (engl. *large*- L) segmenti (Slika 1). Terminalni nukleotidi svakog segmenta genomske RNK su spareni bazama, formirajući nekovalentno zatvorene, kružne RNK (i ribonukleokapside). Svi virusi imaju četiri strukturna proteina: dva vanjska glikoproteina, glikoprotein n (Gn) i glikoprotein c (Gc), gdje n označava njegovu relativnu blizinu amino kraju poliproteina kodiranog M segmentom, a c značava njegovu relativnu blizinu karboksilnom kraju

poliproteina kodiranog također M segmentom. Ostali strukturni proteini su nukleokapsidni protein (N) i veliki (L) protein i RNK-ovisna RNK polimeraza (ICTV, 2011.).



Slika 1. Strategije kodiranja genskih segmenata članova razreda *Bunyaviricetes* (Preuzeto iz: *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), 2011.)

### 2.2.2. Građa genoma

Virusni genom razreda *Bunyaviricetes* sastoji se od tri segmenta negativne ili dvosmjerne jednostruke RNK, označeni kao L, M i S, ukupne veličine između 11 i 19 kilobaza. Svaki od ovih segmenata ima specifičnu funkciju. L segment kodira veliki protein (L protein), koji djeluje kao RNK-ovisna RNK polimeraza i neophodan je za replikaciju RNK virusa. M segment kodira prekursorske glikoproteine omotača (Gn i Gc), koji se nalaze na površini virusa i omogućuju ulazak virusa u stanicu domaćina. S segment kodira nukleokapsidni protein (N protein), koji obavija virusnu RNK i štiti je. Sekvence na 3' i 5' krajevima svakog segmenta genoma su komplementarne i stvaraju "panhandle strukturu" (Slika 2).

U slučaju *Bandavirusa*, organizacija genoma je slična onoj kod virusa iz rodova *Mobuvirus* i *Uukuvirus*. L segment kodira L protein, dok M segment kodira prekursorske glikoproteine (Gn i Gc) (Slika 3). Ranije su ovi glikoproteini bili označavani kao G1 i G2, prema njihovoj veličini utvrđenoj gel elektroforezom. S segment pokazuje dvosmjernu strategiju kodiranja s dva okvira za čitanje (engl. *Open Reading Frame- ORF*), nukleokapsidni protein (N) i nestrukturani protein male mase (engl. *nonstructural small protein- NSs*), koji su odvojeni nekodirajućim intergenskim regijama koje mogu formirati dugu adenin/uracil (A/U) bogatu petlju (Slika 4). Sve faze replikacije odvijaju se unutar citoplazme stanice domaćina (ICTV, 2011.).



Slika 2. Shematski prikaz terminalnih konzerviranih komplementarnih sekvenci genoma *Bandavirus bhanjanagarensis* (BHAV). Zasjenjeni dijelovi prikazuju konzervirane 3' i 5' terminalne nukleotide svakog segmenta (Prilagođeno iz: *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2011.))





### 2.3. Taksonomija i klasifikacija

Razred *Bunyaviricetes* predstavlja najveću skupinu RNK virusa, s više od 350 identificiranih vrsta (PLYUSNIN i sur., 2011.). Ovi virusi, posebno oni iz rodova *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* i *Nairovirus*, prisutni su širom svijeta i mogu se naizmjenično replicirati u kralježnjacima i člankonošcima. Prenose se na kralježnjake ugrizom zaraženih komaraca, krpelja i mušica (*Phlebotominae* i *Culicoides*), uzrokujući brojne značajne bolesti kod ljudi i stoke (NICHOL i sur., 2005.).

Trenutno, nekoliko virusa klasificiranih unutar razreda *Bunyaviricetes* nisu dodijeljeni specifičnim rodovima niti odobreni kao zasebne vrste, zbog nedostatka genetskih informacija i/ili serološke unakrsne reaktivnosti s drugim poznatim bunyavirusima (PLYUSNIN i sur., 2011.). *Forécariah* virus (FORV), *Malsoor* virus (MalV) i *Palma* virus (PALV) pripadaju toj skupini neklasificiranih virusa prema trenutnom popisu Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (ICTV). Virusi su izolirani iz krpelja, stoke i divljih životinja u Indiji, južnoj Europi i Africi (PAVLOV i sur., 1987.). Serološka istraživanja u istočnoj Europi sugeriraju da je BHAV endemičan u toj regiji i da može uzrokovati neprepoznate infekcije kod ljudi (MATSUNO i sur., 2013.).

Prema zadnjim podacima Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa iz 2023. godine, *Bandavirus bhanjanagarensis* pripada carstvu *Riboviria*, kraljevstvu *Orthornavirae*, koljenu *Negarnaviricota*, podkoljenu *Polyploviricotina*, razredu *Bunyaviricetes*, redu *Hareavirales*, obitelji *Phenuiviridae* i rodu *Bandavirus* (ICTV, 2023.).

## 2.4. Tenacitet

Nema puno podataka o tenacitetu (otpornosti) specifičnih za Bandavirus, no dostupna znanstvena istraživanja pokazala su da virusi iz obitelji *Phenuiviridae*, kojoj *Bandavirus* pripada, imaju segmentirane RNK genome i često koriste razne strategije za preživljavanje koje uključuju otpornost na različite uvjete u okolišu. Osjetljivi su na toplinu, lipidna otapala, deterdžente i formaldehid. Sekvencirani genom pokazuje visoku raznolikost, što može ukazivati na dugotrajnu evoluciju i prilagodbu različitim domaćinima i okolišnim uvjetima (MARIN i sur, 1995.; ZANOTTO i sur, 1995.).

## 2.5. Proširenost

Virus je prvi put izoliran 1954. godine iz krpelja *Haemaphysalis intermedia*, koji je pronađen na paraliziranoj kozi u Bhanjanagaru, u indijskoj državi Orissi. Ovaj virus prenose metastrijatni krpelji iz rodova *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* i *Amblyomma*. BHAV je široko rasprostranjen u južnoj i srednjoj Aziji, Africi, kao i u južnoj i dijelovima središnje Europe (Slika 5) (HUBÁLEK, 1987b.). Istraživanja o prirodnim žarištima infekcije BHAV-om u Europi, uključujući Italiju, Hrvatsku, Bugarsku i Slovačku, otkrile su zajedničke karakteristike tih područja (HUBÁLEK, 2010.). Sve te regije imaju submediteransku klimu s toplim, suhim ljetima i blagim, vlažnim zimama ili slične mikroklimatske uvjete. Također su prisutni kserotermni ekosustavi (ekosustavi u kojima prevladavaju vrući i suhi klimatski uvjeti) šuma i travnjaka s biljnim zajednicama poput *Quercetalia pubescentis*, *Festucetalia valesiaca* i *Brometalia erecti*, uključujući i pašnjake. U svim tim područjima prisutna je barem jedna vrsta krpelja kao što su *Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* ili *Hyalomma marginatum*, a također je potrebno da postoji najmanje 60% od 180 bioindikatora za BHAV, što uključuje 157 biljnih vrsta, 4 vrste ixodidnih krpelja i 19 vrsta kralježnjaka.

Na temelju ovih karakteristika, pretpostavlja se da bi BHAV mogao biti prisutan i u drugim europskim regijama kao što su Grčka, južna Francuska (uključujući Korziku),

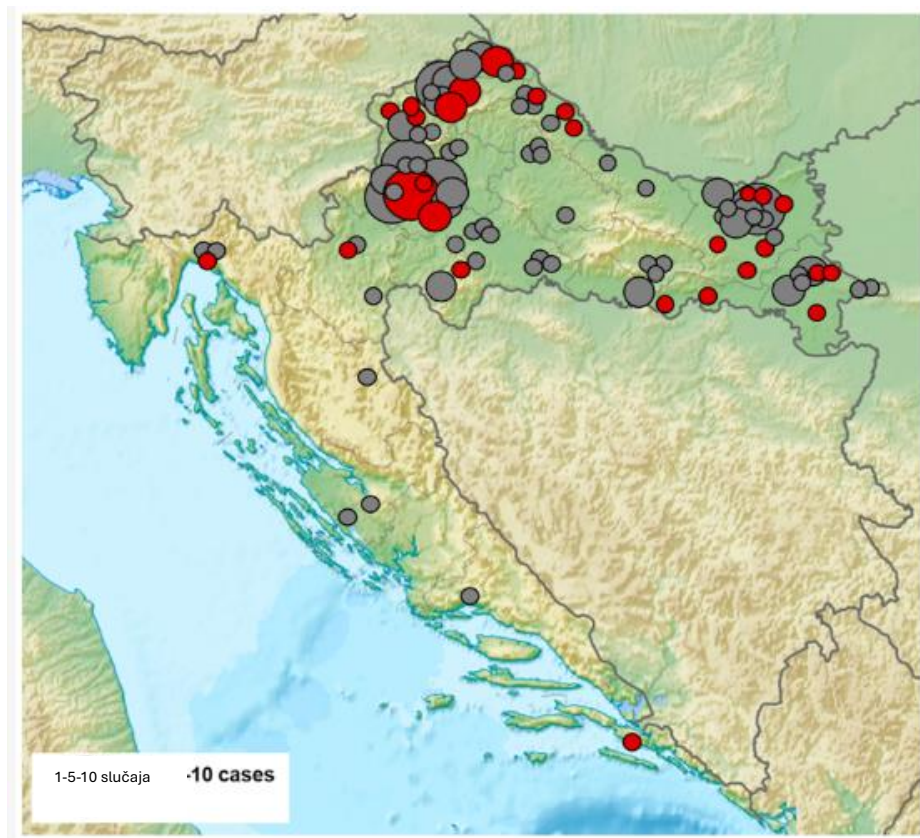
Albanija, Španjolska, Mađarska, europski dio Turske, južna Ukrajina, južna Švicarska, jugoistočna Austrija, južna Njemačka, Moldavija i južni dijelovi europske Rusije (HUBÁLEK, 2010.).



Slika 5. Rasprostranjenost *Bandavirus bhanjanagarensis*. Crne točke: izolacija virusa; krugovi: prisutnost antitijela na BHAV kod kralježnjaka (Prilagođeno iz: HUBÁLEK, 1987b.)

Zanimljivost virusa u Hrvatskoj je ta da postoji poznato prirodno žarište BHAV-a na Braču (jedan od osam prirodnih žarišta u Europi), dok na Hvaru nema poznatog žarišta, makar su to dva bliska i u mnogim aspektima slična dalmatinska otoka. VESENJAK-HIRJAN i suradnici (1991.), otkrili su tokom svog istraživanja protutijela na BHAV kod 31,5% stanovnika (875 ispitanih) na Braču, ali samo kod 1,0% (512 ispitanih) na Hvaru, iako su protutijela na, primjerice, pješčanu muhu ravnomjerno raspodijeljena među stanovnicima oba otoka. Mogući razlog za to je ograničen broj domaćih preživača koji pase na Hvaru, budući da tipični ekstenzivni pašnjaci nedostaju, za razliku od otoka Brača.

Posljedično, gustoća populacije krpelja vektora BHAV-a (*Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor marginatus*) mnogo je niža na Hvaru nego na Braču. Osim toga, biljna zajednica *Ostryo-Carpinion adriaticum* (red *Quercetalia pubescentis*), koja se pojavljuje u središnjem uzvišenom dijelu Brača, ne postoji na Hvaru (HUBÁLEK, 2010.). *Bandavirus* neutralizirajuća (NT) protutijela pronađena su i kod 2,2% stanovnika otoka oko Zadra (srednja Dalmacija) i 7,1% stanovnika sjeverne Hrvatske (VESENJAK- HIRJAN i sur., 1980.). Novije istraživanje VILIBIĆ-ČAVLEK i suradnika (2023.), u ljudi s neurološkim znakovima nejasne etiologije, pokazuje znatnu seroprevalenciju na BHAV u područjima kontinentalne Hrvatske s naglaskom na sjeveroistočnu i istočnu regiju. Manje znatan broj slučajeva potvrđen je u priobalju (Slika 6). VESENJAK- HIRJAN i suradnici (1977.) su potvrdili značajnu seroprevalenciju (100%) BHAV-a u ovaca na otoku Braču. Ovce su u njihovom radu naglašene kao značajan faktor koji omogućuje cirkulaciju i zadržavanje virusa. Noviji podaci infekcije u divljih i domaćih životinja, te kućnih ljubimaca izostaju. Time proširenost virusa u životinjskih vrsta u RH nije dovoljno istražena.



Slika 6. Geografska distribucija pacijenata sa neurološkim simptomima nepoznate etiologije koji su seropozitivni na BHAV (seropozitivni pacijenti - crvene točke, seronegativni pacijenti - sive točke) (Prilagođeno iz: VILIBIĆ- ČAVLEK i sur., 2023.)

## 2.6. Epizootiologija

Epizootiologija infekcije *Bandavirusom bhanjanagarensis* istražuje raspodjelu, načine prijenosa i učestalost ovog virusa među životinjama i ljudima. Glavni prijenosnici ovog virusa su krpelji porodice *Ixodidae* koji virus prenose ugrizom. Ti vektori imaju životni ciklus od jedne do tri godine i koriste različite domaćine kroz nezrele faze, uključujući male sisavce, ptice i guštere, dok se odrasli krpelji hrane na divljim i domaćim papkarima, te rijetko na ljudima (PFÄFFLE i sur., 2017.). Najčešće opisani kralježnjaci domaćini BHAV-a su ovce, koze, goveda, afrički bijeli jež (*Atelerix albiventris*) i afrička zemljana vjeverica (*Xerus erythropus*) (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.). Iako se bolest kod odraslih životinja rijetko manifestira klinički, virus može izazvati ozbiljne kliničke znakove kod mladih preživača poput janjadi, jaradi i teladi. U takvih životinja najčešće je zabilježena groznica s kliničkim znakovima koji ukazuju na oštećenje središnjeg živčanog sustava (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.). Kod ljudi, infekcija ovim virusom dokazano uzrokuje febrilne bolesti sa simptomima poput osjetljivosti na svjetlost, povraćanja, meningoencefalitise i paralize (HUBÁLEK, 2010.; VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.) Prisutnost specifičnih biljnih zajednica, poput *Ostrya-Carpinion adriaticum*, te šumsko-travnati ekosustavi mogu ukazivati na potencijalna žarišta BHAV-a. Gustoća populacije domaćih preživača i krpelja koji prenose virus također igra ključnu ulogu u cirkulaciji virusa na nekom području, te samom prijenosu virusa vektorima na ljude i prijemljive životinje.

## 2.7. Patogeneza

Nema mnogo podataka o patogenezu *Bandavirus bhanjanagarensis*. Dosadašnja istraživanja provedena su na miševima, zamorcima i zečevima koji su bili zaraženi različitim sojevima BHAV-a putem intracerebralne (i.c.), intraperitonealne (i.p.), supkutane (s.c.), intravenske (i.v.), peroralne (p.o.), intranasalne (i.n.) ili konjunktivalne inokulacije. Smrtnost je zabilježena kod dojenih miševa zaraženih svim testiranim putevima (i.p., s.c.), kod odraslih miševa zaraženih i.c. i i.n. putem, te kod odraslih zamoraca zaraženih i.c. putem, dok kod odraslih zečeva nije došlo do smrtnosti ni nakon i.c. inokulacije.

*Bandavirus bhanjanagarensis* pokazuje izrazitu neurotropnost: kod svih uginulih životinja maksimalne koncentracije virusa pronađene su u mozgu, dok je iz drugih tkiva (pluća, jetra, slezena, skeletni mišići, gušterača, limfni čvorovi) i krvi virus izoliran sporadično i u manjim količinama (HUBÁLEK, 1987a.).

## 2.8. Klinička slika

Trenutno su najviše opisane infekcije *bunyavirusima* u ljudskoj populaciji. Osobe zaražene različitim *bunyavirusima* pokazuju različite stupnjeve bolesti, od blage groznice, encefalitisa, hemoragične groznice do akutne respiratorne bolesti (DANDAWATE i sur., 1969.) Zabilježene su promjene u broju leukocita, inicijalna leukopenija praćena leukocitozom. Također promjene su prisutne i u broju eritrocita i trombocita.

Najnovijim istraživanjem prevalencije BHAV-a, kod pacijenata s neuroinvazivnom bolešću nepoznate etiologije, otkrivena je prevalencija od 20,8% seropozitivnih pacijenata u Hrvatskoj, što sugerira da se infekcije BHAV-om često ne prepoznaju. Značajno je zapažanje veće stope seroprevalencije kod pacijenata s meningitisom (44,7%) i febrilnim glavoboljama (22,2%) u usporedbi s meningoencefalitisom i mijelitisom (10,0% svaki), što sugerira da iako je BHAV bolest obično blagog tijeka, kod ljudi koji su razvili neuroinvazivni oblik glavna dijagnoza je učestalo meningitis (VILIBIĆ- ČAVLEK i sur., 2023.). Zbog malog broja sudionika, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdila prevalencija i klinički značaj BHAV-a u Hrvatskoj.

Kao što je već navedeno, ne postoje brojni podaci koji opisuju klinički značaj infekcije BHAV-om u životinja, osim za skupinu preživača. U odraslih ovaca, goveda i koza bolest je asimptomatska ili blagog kliničkog tijeka te često neprepoznata. Janjad, jarad i telad su podložniji razvoju općeg infekcijskog sindroma koji se, kao i u ljudi, može komplicirati kliničkim znakovima oboljenja središnjeg živčanog sustava (HUBÁLEK, 2010.; VILIBIĆ- ČAVLEK i sur., 2023.). Do sada nisu opisani slučajevi razvoja bolesti u kućnih ljubimaca, prvenstveno misleći na pse i mačke, te je navedeno potrebno dodatno istražiti.

## 2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz

Dosadašnja istraživanja patoanatomskih i patohistoloških nalaza BHAV-a uglavnom su provedena na eksperimentalnim životinjama kao što su miševi, zamorci i zečevi. Ova istraživanja pružaju ključne uvide u učinke virusa na različita tkiva i organe. Kod svih uginulih životinja koje su zaražene BHAV-om, najviše koncentracije virusa pronađene su u mozgu, što ukazuje na visoku neurotropnost virusa. Patoanatomski nalazi pokazuju značajne promjene i na organima kao što su slezena, jetra i mozak. U slezeni se opaža povećanje veličine i težine, uz vidljive promjene poput nekroze i krvarenja. Jetra također pokazuje znakove povećanja i promjene boje, uz prisutnost nekrotičnih lezija. U mozgu se mogu primijetiti znakovi encefalitisa sa izraženim promjenama u sivom i bijelom moždanom tkivu. Histološki pregled otkriva različite patološke promjene izazvane BHAV-om. U slezeni su prisutne difuzne nekroze, s infiltracijom monocita i limfocita. Jetra pokazuje znakove degeneracije hepatocita, uz izražene eozinofilne citoplazmatske inkluzije. Virus u mozgu uzrokuje multifokalne nekroze s infiltracijom mikroglia stanica i limfocita. Mikroskopski pregled otkriva prisutnost virusnih inkluzija u citoplazmi zaraženih stanica, što je tipično za ovaj virus (HUBÁLEK, 1987a.).

## 2.10. Dijagnostika

*Bandavirus* se dijagnosticira korištenjem nekoliko metoda, iako ne postoje standardizirani testovi preporučeni od strane Svjetske organizacije za zdravlje životinja (engl. *World Organisation for Animal Health- WOAAH*) (EFSA, 2024.). Najčešće korištena metoda uključuje virus neutralizacijski test (VN), test se koristi za otkrivanje prisutnosti neutralizirajućih antitijela u serumu pacijenata. BHAV se uzgaja u stanicama Vero E6, a zatim se koristi kao antigen u testu neutralizacije virusa. Fiksacija komplemenata koristi se za detekciju antitijela koja fiksiraju komplement u serumu pacijenata. Također se koriste imunoenzimni test i test inhibicije hemaglutinacije. Molekularni testovi, kao što je qRT-PCR, koriste se za detekciju RNK virusa u kliničkim uzorcima. Ovi testovi su osjetljivi i

specifični za otkrivanje prisutnosti *Bandavirusa* u krvi ili drugim tjelesnim tekućinama (CDC, 2024.).

### 2.11. Liječenje

Liječenje BHAV-a uglavnom se temelji na simptomatskom pristupu. Uključuje određene terapijske postupke s ciljem ublažavanja simptoma i sprječavanje komplikacija. Održavanje adekvatne hidratacije izuzetno je važno kod ljudi, osobito ako pacijent ima groznicu ili povraća. Dovoljan unos tekućine pomaže u sprječavanju dehidracije. Za snižavanje visoke temperature i ublažavanje bolova kod ljudi koriste se antipiretici i nesteroidni protuupalni lijekovi. Lijekovi pomažu u kontroli simptoma i poboljšanju općeg stanja pacijenta. Odmor je također ključan kod ljudi kako bi tijelo imalo dovoljno energije za borbu protiv infekcije i za oporavak. Što se tiče životinja, postupci za liječenje sličnih kliničkih znakova, nisu dovoljno istraženi (CALISHER i GOODPASTURE, 1975.).

### 2.12. Profilaksa i imunoprofilaksa

Preventivne mjere su izuzetno važne za smanjenje rizika od infekcije posebno u područjima gdje su krpelji glavni vektori prijenosa. Preporučuje se korištenje repelenata protiv insekata, nošenje zaštitne odjeće te izbjegavanje područja s visokom populacijom krpelja. Primjena ovih mjera može značajno smanjiti rizik od infekcije i pomoći u ublažavanju simptoma kod zaraženih osoba, omogućujući brži oporavak i smanjenje komplikacija (CALISHER i GOODPASTURE, 1975.). Kod ovaca je dovoljno prskanje ili kupanje u otopini akaricida jednom godišnje da bi se invazija krpeljima držala pod kontrolom. Važno je tretirati sve ovnove i ovce prije nego ih se uvede u stado. Kupanje pruža temeljitiju zaštitu od prskanja, ali prskanje također može biti učinkovito. Prskalice visokog tlaka su praktičnije i obično učinkovitije za velike stada (WARD i sur., 2017.).

Imunoprofilaksa BHAV-a, kao i drugih virusa, uključuje niz preventivnih mjera usmjerenih na jačanje imunološkog sustava i sprječavanje infekcije. Trenutno ne postoji



specifično cjepivo u ljudi niti u životinja. Patogenost *Bandavirusa* pokazuje značajnu varijabilnost ovisno o dobi ovaca. Istraživanja su pokazala da je patogenost ovog virusa znatno veća kod mladih janjaca u usporedbi s juvenilnim ili odraslim ovacima. Ovaj podatak upućuje na potrebu za posebnom pažnjom u zaštiti mlađih jedinki stada. Također, postoji pretpostavka da bi se infekcija BHAV-om u prirodnim uvjetima mogla pojačati kod juvenilnih i odraslih ovaca u određenim okolnostima. Okolnosti uključuju masovnu infestaciju i intoksikaciju ovaca krpeljima, što posljedično može oslabiti njihov imunološki sustav i povećati njihovu osjetljivost na virus. Imunosupresija može biti uzrokovana različitim čimbenicima, uključujući stres, lošu prehranu, prisutnost drugih bolesti ili parazita. Oslabljeni imunološki sustav čini ovce podložnijima infekcijama, uključujući infekcije BHAV-om. Prisutnost drugih patogenih mikroorganizama može dovesti do koinfekcije, što dodatno komplicira zdravstveno stanje ovaca. Koinfekcija može pojačati učinke virusa i rezultirati težim kliničkim manifestacijama bolesti. Razumijevanje ovih čimbenika ključno je za razvoj učinkovitih strategija prevencije i kontrole infekcija BHAV-om kod ovaca. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se bolje razumjeli mehanizmi patogenosti ovog virusa i razvili odgovarajući preventivni i terapijski pristupi (MÁDR i sur., 1984.).

### 2.13. Javno zdravstvo

*Bandavirus bhanjanagarensis* predstavlja značajan izazov za javno zdravstvo, posebno u ruralnim područjima gdje su ljudi i životinje često izloženi krpeljima, glavnim vektorima ovog virusa. BHAV može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod životinja, posebice ovaca, a potencijalno i kod ljudi. Prijenos BHAV-a odvija se putem ugriza zaraženih krpelja. Ljudi koji rade ili borave u područjima s visokom populacijom krpelja, kao što su poljoprivrednici, stočari i šumari, posebno su izloženi riziku od infekcije. Poznavanje distribucije i sezonske aktivnosti krpelja ključno je za procjenu rizika od infekcije i učinkovitu prevenciju. Prevencija i kontrola širenja virusa oslanja se na nekoliko ključnih preventivnih mjera, s obzirom na to da trenutno ne postoji specifično cjepivo za ovaj virus. Kontrola krpelja putem uporabe akaricida, nošenje zaštitne odjeće te redovita provjera ljudi i životinja na prisutnost krpelja su neke od glavnih preventivnih mjera. Edukacija stanovništva o rizicima i preventivnim mjerama ključna je za smanjenje rizika od infekcije.

Upravljanje *Bandavirusom* zahtijeva multidisciplinarni pristup koji uključuje epidemiološki nadzor, preventivne mjere, edukaciju i suradnju između različitih sektora. Iako je trenutno dostupno ograničeno znanje o BHAV-u, daljnja istraživanja i razvoj preventivnih strategija ključni su za zaštitu javnog zdravlja i sprječavanje budućih epidemija. Razumijevanje i primjena ovih strategija mogu značajno smanjiti rizik od infekcije i poboljšati zaštitu javnog zdravlja u ugroženim područjima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Odabir uzorka

U istraživanje su uključeni serumi prikupljeni tokom rutinskih pregleda životinja na Klinici za zarazne bolesti, koja je u sklopu Sveučilišne veterinarske bolnice Veterinarskog fakulteta. Uzorci seruma pasa i mačaka sakupljeni su tijekom lipnja 2022. godine. Pri odabiru uzoraka, u obzir su dolazili oni uzorci kojima su bili dostupni anamnestički podaci i medicinski zapisi životinja. U Virološkom laboratoriju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uzorci su čuvani na temperaturi od -20 °C. Ukupno je analizirano 159 uzoraka seruma pasa i 55 uzoraka seruma mačaka.

#### 3.2. Prikupljanje podataka

Podaci potrebni za statističku analizu prikupljeni su iz medicinskih zapisa zaprimljenih životinja. U istraživanju su korišteni podaci poput: vrste, pasmine, dobi, spola, razloga dolaska, rezultata kliničkog pregleda te mjesta prebivališta i eventualnog porijekla iz skloništa za nezbrinute životinje.

#### 3.3. Dokaz prisutnosti protutijela za *Bandavirus*

U Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu proveden je virus neutralizacijski test (VN test) za detekciju protutijela protiv BHAV-a. Ova serološka metoda dijagnostike koristi se za mjerenje koncentracije neutralizacijskih protutijela u serumu. Neutralizacijska reakcija izvodi se u jažicama mikrotitracijskih pločica gdje se serumi u serijskim razrjeđenjima inkubiraju sa specifičnom dozom virusa i staničnim kulturama. Prisutnost neutralizacijskih protutijela potvrđuje se kada nema vidljivog citopatogenog učinka (CPU) virusa na stanicama koje su bile u kontaktu s testiranim serumom. Serumi se pretražuju screening metodom, u razrjeđenjima od 1:5 i 1:10. Uzorci koji nisu pokazivali CPU na razrjeđenju 1:10, odnosno

oni koji su bili pozitivni dodatno su pretraženi u razrjeđenjima raspona od 1:5 do 1:640. Tijekom interpretacije rezultata, važno je razlikovati nespecifične citotoksične učinke pojedinih seruma na stanične kulture. Nespecifična citotoksičnost može rezultirati lažno negativnim ishodima, stoga je ključno pažljivo odabrati uvjete eksperimenta i kontrolirati sve varijable tijekom testiranja. Dodatne validacije i ponovljeni testovi osiguravaju pouzdanost rezultata i pravilnu interpretaciju prisutnosti neutralizacijskih protutijela.

### 3.4. Opis postupka

#### 3.4.1. Materijali

Uzorak: serum

Pribor i oprema:

Mikropipete i dodaci

- Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 10 – 100  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 100 – 1000  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Višekanalna (12) automatska mikropipeta zapremine 10 - 100  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Sterilni nastavci za pipete

Epruvete i stalci

- Epruvete zapremine 1.5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Epruvete zapremine 15 i 50 ml (Falcon. BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey)
- Stalac za Eppendorf epruvete

### Mikrotitracijske plitice

- Mikrotitracijske plitice s 96 jažica, ravnim dnom i poklopcem

### Plastične bočice

- Plastične bočice za uzgoj staničnih kultura

### Ostali laboratorijski pribor

- Voodootporni marker
- Lateks rukavice
- Samoljepljive naljepnice
- Samoljepljiva traka

### Oprema za kontrolu temperature

- Termostat s ugljikovim dioksidom (CO<sub>2</sub>) 37 °C
- Vodena kupelj 56 °C
- Hladnjak sa temperaturom +4 °C
- Hladnjak sa temperaturom -20 °C
- Hladnjak za duboko smrzavanje sa temperaturom -80 °C

### Sterilizacija i zaštita od kontaminacije

- Autoklav (AV500x700) (INKOlab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Laminarna komora (LFVP 12) (Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija)

### Mikroskopija

- Invertni svjetlosni mikroskop (Olympus, Tokio, Japan)

## Dokumentacija

- Radni obrazac za izvođenje i evidenciju VN-testa (Slika 7)
- Radni obrazac za izračun titra virusa po Reed-Muench-ovoj metodi (Slika 8)

## Reagensi:

### Medij za kulturu stanica

- Dulbeccov modificirani medij Eagle (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM),

### Serum za kulturu stanica

- 5 %-tni goveđi fetalni serum (engl. *Fetal calf serum* - FCS)

### Stanice

- E6 Vero stanice ( $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) u DMEM-u obogaćenom FCS-om

### Virus

- Virus BHAV-1 ATCC VR-444

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, VETERINARSKI FAKULTET  
 ODJEL ZA VETERINARSKO JAVNO ZDRAVSTVO I SIGURNOST HRANE  
 ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM  
 RADNI OBRAZAC ZA IZVOĐENJE I EVIDENCIJU VN-TESTA ZA BHAV VIRUS

OZNAKA PLITICE: 1. OZNAKA VIRUSA: BHAV-1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Kontrolna stanica	A					/	/	/	/	/	/	/	/	1:640	
	B					/	/	/	/	/	/	/	/	1:320	
Kontrolna titracija standardne virusne doze	C	/	/			/	/	/	/	/	/	/	/	1:160	
	D	/	/			/	/	/	/	/	/	/	/	1:80	
	E	/	/			/	/	/	/	/	/	/	/	1:40	
	F	/	/			/	/	/	/	/	/	/	/	1:20	
	G	/	/	/								/	/	1:10	
	H	/	/	/										1:5	
			100 TCID <sub>50</sub>	10 TCID <sub>50</sub>	1 TCID <sub>50</sub>	0.1 TCID <sub>50</sub>	Pretraživani serum				Pretraživani serum				
							51	109	161	103					
								1:28							

Ranije određeni titar nacionalnog referentnog seruma \_\_\_\_\_

Očitani titar nacionalnog referentnog seruma \_\_\_\_\_

	Oznaka seruma	Titlar
Titar pretraživanih seruma:	_____	_____

Datum i vrijeme postavljanja pretrage: 19. 1. 2024.

Pretragu postavio: Novac

Datum i vrijeme očitavanja pretrage: 23. 1. 2024.

Pretragu očitao: \_\_\_\_\_

Slika 7. Prikazuje radni obrazac korišten za izvođenje i evidenciju VN-testa za BHAV virus

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, VETERINARSKI FAKULTET  
 ODJEL ZA VETERINARSKO JAVNO ZDRAVSTVO I SIGURNOST HRANE  
 ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM  
 RADNI OBRAZAC ZA IZRAČUNAVANJE TITRA VIRUSA PO REED-MUENCH-OVOJ METODI I  
 IZRAČUNAVANJE RAZRIJEĐENJA VIRUSA ZA PRIREĐIVANJE STANDARDNE VIRUSNE DOZE  
 OB-ARTERlab-5.4-09-01

OZNAKA PLITICE: BAHV-2.2.15-1. OZNAKA VIRUSA: \_\_\_\_\_

DATUM OČITAVANJA TITRACIJE: \_\_\_\_\_

Razrijeđenje virusa	Broj jažica s izraženim CPU	Broj jažica bez CPU	Kumulativne vrijednosti			Postotak jažica s CPU
			Jažice s izraženim CPU (A) (od 10 <sup>4</sup> prema 10 <sup>1</sup> )	Jažice bez izraženog CPU (B) (od 10 <sup>1</sup> prema 10 <sup>4</sup> )	Ukupno (A+B)	
10 <sup>-1</sup>	10 ↑	0 ↓	40	0	40	100 %
10 <sup>-2</sup>	10 ↑	0 ↓	50	0	30	100 %
10 <sup>-3</sup>	10 ↑	0 ↓	20	0	20	100 %
10 <sup>-4</sup>	10 ↑	0 ↓	10	0	10	100 %
10 <sup>-5</sup>	0 ↑	10 ↓	0	10	10	0 %
10 <sup>-6</sup>	0 ↑	10 ↓	0	20	20	0 %
10 <sup>-7</sup>	0 ↑	10 ↓	0	30	30	0 %
10 <sup>-8</sup>	0 ↑	10 ↓	0	40	40	0 %

Proportionalni razmak =  $\frac{(\% \text{ jažica s CPU iznad } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ jažica s CPU iznad } 50\%) - (\text{postotak jažica s CPU ispod } 50\%)}$  =  $\frac{100\% - 50\%}{100\% - 0\%} = \frac{50}{100} = 0,5$

Negativan logaritam inokulirane količine virusa =  $\frac{\text{negativan logaritam razrijeđenja u kojem je postotak jažica s CPU iznad } 50\%}{\text{proportionalni razmak}}$  =  $4 - 0,5 = -4,5$

Titar inokulirane količine virusa (25 µl) =  $10^{-4,5} = 31622,7$  TCID<sub>50</sub>

Potrebno razrijeđenje titriranog virusa za priređivanje SVD (100 TCID<sub>50</sub>) =  $1: 316 \times$

Datum i vrijeme izračunavanja titra i potrebnog razrijeđenja: \_\_\_\_\_

Titar i razrijeđenje izračunao: \_\_\_\_\_

Slika 8. Prikazuje radni obrazac za izračun titra virusa po Reed-Muench-ovoj metodi i izračun razrijeđenja virusa za pripremu standardne virusne doze

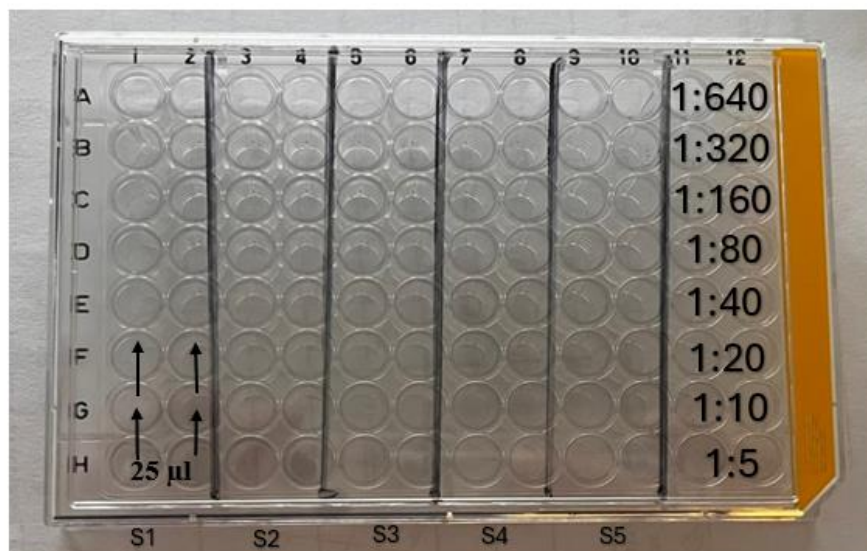


### 3.4.2. Izvođenje postupka

Broj mikrotitracijskih plitica s ravnim dnom koji je potreban za istraživanje, određuje se na temelju ukupnog broja seruma koji se pretražuju. Na poklopcima plitica, koristeći vodootporni marker, označuju se pozicije svakog seruma. U svaku jažicu plitice dodaje se 25  $\mu$ l DMEM-a obogaćenog s 5%-tnim FCS-om, osim u kontrolnim jažicama stanica i u svim jažicama H reda, gdje se dodaje testirani serum. Kontrola stanica provodi se u svakom VN-testu. U jažicama A1 do A4 te B1 do B4 dodaje se po 50  $\mu$ l DMEM-a s FCS-om. Prva faza istraživanja je screening uzoraka, razrjeđenjima 1:5, 1:10. U jažice H reda, u dva stupca, dodamo 40  $\mu$ l DMEM-a s FCS-om i nakon toga 10  $\mu$ l seruma. U sljedeći G red, također u dva stupca, pipetom prenosimo po 25  $\mu$ l izmiješanog sadržaja iz H reda. Tako nastavljamo i u F i E, D i C, B i A redu (Slika 9). Daljim razrjeđenjima su podvrgnuti uzorci na kojima se ne očituje CPU virusa što je ujedno druga faza istraživanja. Na prvoj plitici, počevši od jažica H5 i H6, započinje se s analizom uzoraka, pri čemu se najprije dodaje 40  $\mu$ l DMEM-a s FCS-om. Ista količina DMEM-a koristi se u H redovima na ostalim pliticama. Razrjeđenja testiranih seruma pripremaju se tako da se u H redove dodaje po 10  $\mu$ l seruma. Sadržaj se temeljito miješa korištenjem pipete, kojom se sadržaj najmanje pet puta povuče i ispusti u istu jažicu. Nakon toga, pipetom se prenosi po 25  $\mu$ l izmiješanog sadržaja iz H reda u G red, gdje se sadržaj ponovno miješa na isti način. Ovaj proces miješanja i prebacivanja se nastavlja sve do A reda, iz kojeg se na koncu odbaci 25  $\mu$ l sadržaja. Ovim postupkom se postižu dvostruka razrjeđenja seruma u rasponu od 1:5 – 1:640 (Slika 10).



Slika 9. Prikaz početne mikrotitracijske plitice screening testa. Označena su područja kontrole stanica, deseterostrukih uzastopnih razrjeđenja standardne virusne doze (100/10/1/0.1) i pretraživanih seruma (S1 do S16).



Slika 10. Prikazan je daljnji postupak razrjeđivanja seruma u kojem su screening testom utvrđena protutijela na virus, zajedno s postignutim razrjeđenjima seruma u pojedinim redovima.

Prilikom izvođenja VN testa, važno je kontrolirati standardnu virusnu dozu (SVD). Postupak započinje pripremom deseterostrukih uzastopnih razrjeđenja SVD na prvoj mikrotitracijskoj plitici. Razrjeđenja se pripremaju u četiri Eppendorf epruvete. U prvu epruvetu stavi se 450  $\mu$ l virusa u SVD, dok se u preostale tri epruvete stavi po 450  $\mu$ l DMEM-a s 5% FCS-om. Iz prve epruvete se uzme 50  $\mu$ l virusa u SVD i prebaci u drugu epruvetu te se pipetiranjem promiješa. Zatim se 50  $\mu$ l iz druge epruvete prenese u treću epruvetu i promiješa, a na kraju se 50  $\mu$ l iz treće epruvete prebaci u četvrtu epruvetu i promiješa. Nakon što su razrjeđenja pripremljena, sadržaj se prenosi na pliticu. Iz prve epruvete, koja sadrži virus u SVD od 100 TCID<sub>50</sub>, doda se po 25  $\mu$ l sadržaja u jažice od H1 do C1. Sadržaj druge epruvete, s virusom razrijeđenim na 10 TCID<sub>50</sub>, dodaje se po 25  $\mu$ l u jažice od H2 do C2. Iz treće epruvete, gdje je SVD razrijeđena na 1 TCID<sub>50</sub>, ista količina dodaje se u jažice od H3 do C3. Konačno, sadržaj četvрте epruvete, gdje je virus razrijeđen na 0.1 TCID<sub>50</sub>, prenosi se u jažice od H4 do C4.

U sve ostale jažice svih plitica, osim kontrole stanica, dodaje se po 25  $\mu$ l standardne virusne doze koja sadrži 100 TCID<sub>50</sub>. Plitice se zatim inkubiraju jedan sat u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37 °C. Nakon inkubacije, u sve jažice svih plitica dodaje se po 50  $\mu$ l suspenzije prethodno pripremljenih E6 Vero stanica. Suspenzija stanica se priprema u DMEM-u s dodatkom 5% goveđeg fetalnog seruma. Plitice pripremljene na opisani način inkubiraju se u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> pri 37 °C do očitavanja rezultata, koje se radi peti dan.

Nakon završetka inkubacije, prvo se pregledava kontrola stanica. Jažice s kontrolom stanica trebaju sadržavati konfluentan sloj E6 Vero stanica (Slika 11). Ako se primijete bilo kakvi znakovi toksičnosti ili citopatskog učinka (CPU), test se smatra nevaljanim. Ako je kontrola stanica zadovoljavajuća, prelazi se na očitavanje daljnjih rezultata.

Kontrolna titracija standardne virusne doze (SVD) provjerava se na prisutnost CPU-a (Slika 12). CPU mora biti prisutan u svim jažicama koje sadrže 100 i 10 TCID<sub>50</sub> virusa, te u dvije do četiri jažice koje sadrže 1 TCID<sub>50</sub>. Ako titracija SVD ne pokaže CPU u jažicama sa 100, 10 i 1 TCID<sub>50</sub>, potrebno je ponovno titrirati virus kako bi dobili željene rezultate. Ako titracija pokaže CPU i u jažicama sa 0.1 TCID<sub>50</sub>, količina virusa je veća od dozvoljene i test se smatra nevaljanim.

Jažice u kojima CPU zahvaća više od 50% sloja stanica označavaju se kao negativne na radnim obrascima. Jažice bez izraženog CPU-a ili s CPU-om koji zahvaća manje od 50% površine stanica označavaju se kao pozitivne. Serumi u kojima CPU nije izražen pri razrjeđenju 1:8 ili većem smatraju se pozitivnima na prisutnost antitijela protiv BHAV-1. Titar antitijela određuje se prema posljednjem razrjeđenju u kojem nije zabilježen CPU. Ovaj postupak očitavanja rezultata omogućava preciznu procjenu prisutnosti neutralizirajućih antitijela i validnost testa.



Slika 11. Prikaz sloja E6 Vero stanica.  
Povećanje 10x/0,13 PhL.



Slika 12. Izražen citopatogeni  
učinak virusa BHAV-1. Povećanje  
4x/0,13 PhL.

### 3.5. Statistička obrada podataka

U ovom diplomskom radu korištene su metode deskriptivne i analitičke statistike za analizu prikupljenih podataka. Deskriptivna statistika omogućila je osnovni pregled i sažimanje podataka, dok su analitičke metode korištene za dublje razumijevanje i testiranje hipoteza. Deskriptivna statistika uključivala je izračunavanje frekvencija, postotaka, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za različite varijable u uzorku. U analitičkoj statistici korištene su sljedeće metode. Omjer izgleda (engl. *Odds ratio*- OR) je korišten za procjenu omjera šansi između dvije skupine. Primjerice, izračunat je OR za pozitivne i negativne slučajeve među psima i mačkama, te među križancima i čistokrvnim psima. Hi-kvadrat test ( $\chi^2$  test) korišten je za ispitivanje povezanosti između varijabli. Na primjer, korišten je za testiranje povezanosti između pozitivnih slučajeva (varijabla koja označava je li rezultat pozitivan ili negativan) i različitih skupina pasa (varijabla koja označava pripadnost čistokrvnoj pasmini ili križancima). Fisherov egzaktni test korišten je za analizu malih uzoraka i testiranje hipoteza gdje su očekivane frekvencije niske.

#### 4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirano je ukupno 159 pasa i 55 mačaka. Od ukupnog broja pasa mužjaci su bili zastupljeni u 50,94% (81 pas), a kuje u 40,06% (78 kuja). Napravljena je dobna struktura kojom su psi raspoređeni u tri dobne skupine. Prvu skupinu čine životinje do pet godina starosti, gdje je sveukupno zabilježeno 57 (35,85%) jedinki. U drugu skupinu je smješteno 58 jedinki (36,48%) starosti od pet do deset godina, dok treću skupinu čine 44 životinje (27,67%) starosti 11 do 16 godina (Tablica 1).

Tablica 1. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa po dobnim kategorijama.

	POZITIVNO		NEGATIVNO		Ukupno
<5 godina	6	10,53%	51	89,47%	57
5-10 godina	6	10,34%	52	89,66%	58
11-16 godina	6	13,64%	38	86,36%	44
Ukupno	18		141		

Prema pripadnosti određenoj pasmini, populacija pasa je podijeljena u skupinu križanci 60 (37,74%) i skupinu čistokrvne pasmine 99 (62,26%) (Tablica 2). Unutar skupine čistokrvnih pasmina, različite pasmine bile su zastupljene s manjim brojem jedinki, uključujući labrador retrievere, shi-tzue, velike gubičare i druge. Svi uzorkovani psi u trenutku istraživanja obitavali su na teritoriju Republike Hrvatske (RH), a za potrebe istraživanja podijeljeni su u skupinu pasa koji obitavaju na području Grada Zagreba i skupinu pasa iz okolnih područja (uključujući ostale županije RH). Ukupno je 121 (76,1%) pas uzorkovan sa područja županije Grad Zagreb, dok je preostalih 38 pasa (23,9%) iz ostalih dijelova RH (Tablica 3). Veći dio uzorkovanih pasa potječe iz domaćinstava, njih 156, dok su samo tri pripadala nekom skloništu za životinje. Od 159 pasa, njih 84 (52,83%) je bilo s kliničkim znakovima neke bolesti, dok ostalih 75 (47,17%) je u trenutku uzimanja uzorka bilo zdravo.

**Tablica 2.** Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti između čistokrvnih pasa i križanaca.

	POZITIVNO		NEGATIVNO		Ukupno
Čistokrvni	9	15%	51	85%	60
Križanci	9	9,1%	90	90,9%	99
Ukupno	18		141		

**Tablica 3.** Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa s područja županije Grada Zagreba i ostalih dijelova Republike Hrvatske.

	POZITIVNO		NEGATIVNO		Ukupno
Grad Zagreb	12	9,92%	109	90,08%	121
Okolica	6	15,79%	32	84,21%	38
Ukupno	18		141		

Analizirano je ukupno 55 mačaka, a kod niti jedne nije zabilježena prisutnost antitijela na *Bhanja Bandavirus*. Izostanak pozitivnih slučajeva može se dijelom pripisati veličini uzorka, ali i mogućim raznolikim faktorima koji utječu na osjetljivost mačaka na ovaj virus. Iako nije provedena statistička analiza povezanosti spola s prisutnošću virusa, razlike bi se mogle detaljnije istražiti u budućim studijama s većim brojem uzoraka. Što se tiče dobi, mačke u uzorku pripadaju različitim starosnim skupinama, no nijedna dobna kategorija nije imala zabilježenu prisutnost virusa. Zbog odsutnosti pozitivnih slučajeva, nije bilo moguće utvrditi eventualnu povezanost između starosti mačke i osjetljivosti na BHAV. U uzorku su bile zastupljene i čistokrvne i križane mačke, no nijedna od tih kategorija nije pokazala prisutnost virusa. Također, nisu primijećene razlike između bolesnih i zdravih mačaka, kao ni među onima koje su pokazivale neurološke kliničke znakove u odnosu na one bez. Većina mačaka u uzorku dolazi iz kućanstava, dok su neki uzorci prikupljeni iz skloništa za životinje. Ova razlika nije pokazala nikakvu povezanost s prisutnošću virusa, iako bi veći broj uzoraka iz različitih izvora mogao otkriti potencijalne razlike između populacija koje žive u različitim uvjetima. Mačke s područja Grada Zagreba i one iz okolnih dijelova

Hrvatske također nisu pokazale razlike u prisutnosti virusa, iako bi dodatna analiza, s većim brojem uzoraka, mogla pružiti bolje uvid u eventualne geografske razlike u učestalosti virusa. S obzirom da nije rađena analitička statistika, deskriptivna statistika je prikazana unutar tablice (Tablica 4).

Tablica 4. Značajke uzorka mačaka u istraživanju.

<b>PASMINA</b>			Ukupno
Križane pasmine		Čistokrvne	
49		6	55
<b>DOB</b>			
<5 godina	5-10 godina	>10 godina	
21	14	20	55
<b>SPOL</b>			
Mušjaci		Ženke	
23		32	55
<b>ZDRAVSTVENO STANJE</b>			
Bolesne		Zdrave	
41		14	55
<b>NEUROLOŠKI KLINIČKI ZNAKOVI</b>			
DA		NE	
9		46	55
<b>LOKACIJA</b>			
Grad Zagreb		Okolica	
42		13	55
<b>AZIL/ UDRUGA</b>			
DA		NE	
2		53	55



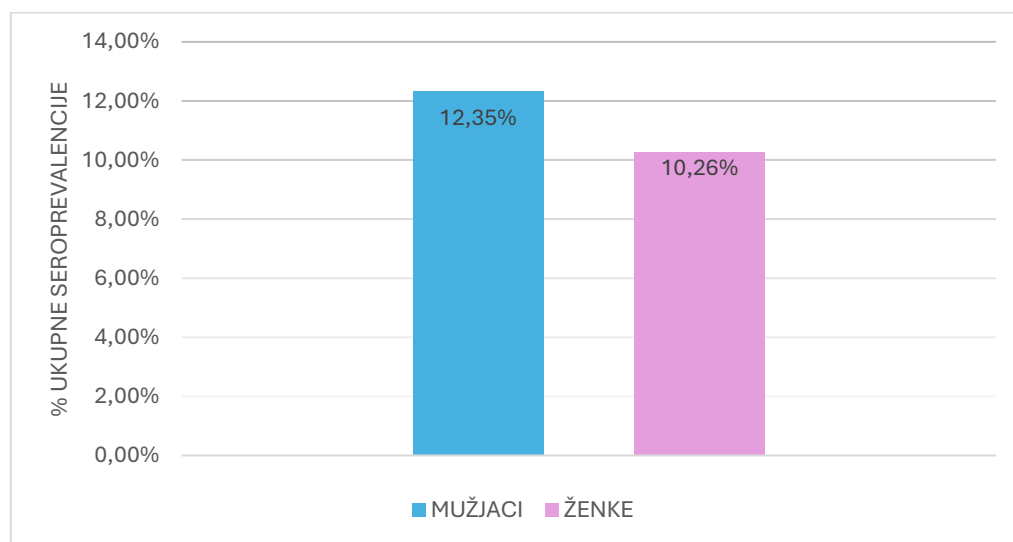
Seroprevalencija je izračunata kao postotak pozitivnih uzoraka u odnosu na ukupan broj ispitanih uzoraka. Virus neutralizacijskim testom dokazana je serokonverzija za *Bhanja Bandavirus* u kućnih ljubimaca na teritoriju Republike Hrvatske. Seroprevalencija u populaciji pasa iznosi 11,32%, dok u mačjoj populaciji nije zabilježen niti jedan serološki pozitivan uzorak (Tablica 5). Fisherovim egzaktnim testom nije dokazana statistički značajna razlika u vrijednosti seroprevalencije pasa i mačaka ( $p=0,06$ ). Zbog nedostatka pozitivnih slučajeva kod mačaka, daljnja analiza povezanosti epizootioloških čimbenika i kliničkih znakova s pozitivnim rezultatom serološkog testa, provedena je samo u pasa. Usporedba seroprevalencije između različitih dobnih skupina pasa pokazala je kako nema statistički značajne razlike u broju serološki pozitivnih uzoraka između tri definirane dobne skupine ( $\chi^2$  test = 0,33,  $p=0,85$ ). Što se tiče spola, seroprevalencija kod mužjaka iznosila je 12,35%, dok je kod ženki bila 10,26% (Slika 13.). Razlika navedenih seroprevalencija nije bila statistički značajna kako bi se spol prikazao kao značajan epizootiološki faktor (OR= 1,23; 95% CI= 0,46-3,31;  $p=0,68$ ). Analiza seroprevalencije između križanaca i čistokrvnih pasa pokazala je da obje skupine imaju podjednaku vjerojatnost da daju pozitivan rezultat serološkog testa (OR= 1,76; 95% CI= 0,66-4,72,  $p=0,26$ ). Slično tome, statističkom analizom podataka o području obitavanja nije utvrđena značajna razlika vrijednosti seroprevalencije među navedenim skupinama (OR = 0,59; 95% CI: 0,20-1,69,  $p=0,32$ ). Pripadnost kućanstvu ili skloništu za životinje, isto tako, nije dovedeno u značajnu povezanost sa rezultatom serološkog testiranja (OR= 4,09, CI= 0,35-47,51,  $p=0,3$ ). Analizirana je povezanost između seropozitivnosti i bolesnog psa. Od 84 bolesna psa, deset pasa (11,9%) bilo je seropozitivno, dok je 74 pasa (88,1%) bilo seronegativno. S druge strane, od 75 zdravih pasa, osam pasa (10,66%) bilo je seropozitivno, dok je 67 pasa (89,34%) bilo seronegativno.  $\chi^2$  test dao je vrijednost od 0,06 s  $p$ -vrijednošću od 0,81, što ukazuje da nema statistički značajne razlike između bolesnih i zdravih pasa u pogledu seropozitivnosti. Omjer izgleda (OR) je 1,13, što znači da bolesni psi imaju malo veću šansu biti seropozitivni, ali ta razlika nije statistički značajna (95% CI= 0,42 - 3,03;  $p=0,81$ ). Za razliku od navedenih epizootioloških faktora, procjena povezanosti kliničkih znakova i pozitivnog serološkog rezultata za protutijela *Bhanja bandavirusa* u kućnih ljubimaca bila je onemogućena zbog strukture samog uzorka. Posljedično tome iz uzorka su izdvojene samo životinje sa akutnim neurološkim znakovima te su njihovi rezultati serološkog testa podvrgnuti statističkoj analizi. Hi-kvadratom nije utvrđena statistički značajna povezanost između navedenih varijabli (OR = 1,13, 95% CI= 0,42-3,04,  $p=0,06$ ). Zaključno, rezultati

ovog istraživanja ukazuju na to da, iako postoji značajna razlika u seroprevalenciji između pasa i mačaka, drugi analizirani faktori kao što su dob, spol, pasmina, prisutnost neuroloških kliničkih znakova, lokacija i mjesto boravka nisu značajno utjecali na seropozitivnost u ispitivanoj populaciji pasa. Za bolju procjenu prisutnosti protutijela te posljedičnu značajnost epizootioloških faktora na infekciju *Bhanja bandavirusom* u mačjoj populaciji, potrebno je bolje definirano istraživanje na mačkama koje obuhvaća veći uzorak i veći broj životinja koje nisu ograničene na zatvoreni prostor.

Tablica 5. Usporedba seropozitivnosti i seronegativnosti pasa i mačaka.

	POZITIVNO		NEGATIVNO		Ukupno
Psi	18	11,32%	141	88,68%	159
Mačke	0	0%	55	100%	55
Ukupno	18		196		

Slika 13. Usporedba seroprevalencije između mužjaka i ženki psa.



## 5. RASPRAVA

Klimatske, ali i sociološke i ekonomske promjene sve više naglašavaju potrebu za istraživanjem uzročnika koji su do prije par desetaka godina izazivali bolesti svrstane u grupu tropskih ili egzotičnih zaraznih bolesti. Danas vidimo sve češću pojavu patogena, ali i vektora iz tropskih i suptropskih zemalja te pojavu kliničkih i supkliničkih slučajeva infekcije ili invazije u životinja i ljudi (SANTINI i sur, 2015.; KLOBUČAR i sur, 2019.). Među navedenim virusnim uzročnicima posebna pozornost pridaje se virusima prenosivim vektorima (*arbovirusima*) kao što su komarci, krpelji i papatači. Navedeni uzročnici učestalo uzrokuju bolesti ljudi s blažim kliničkim tijekom, no određeni udio izaziva teže neurološke simptome s posljedičnim smrtnim ishodom (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur, 2018.) Rjeđe dokazani, ali potencijalno sve više značajni, su i virusi razreda *Bunyaviricetes* (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2023.). *Bhanja Bandavirus* (BHAV) prvi put je opisan u populaciji ljudi na području bivše Jugoslavije 1986. godine. Kao posebna epidemiološka jedinica naveden je otok Brač (danas teritorij RH) s dokazanim cirkulirajućim protutijelima u 31,5% otočana, dok je na teritoriju Sjeverne Hrvatske u to vrijeme zabilježena seroprevalencija od samo 5,5% (PUNDA i VESENJAK-HIRJAN, 1986.). VILIBIĆ-ČAVLEK i suradnici (2023.) dokazuju seroprevalenciju BHAV-a u 20,8% pacijenata s neurološkim simptomima nepoznate etiologije. Navedena seroprevalencija, unatoč tome što 2023. godine seroprevalencija nije opisana u općoj populaciji, te pojava novih žarišta na teritoriju Hrvatske, naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjem proširenosti navedenog uzročnika te bolje razumijevanjem epidemiologije bolesti.

U svrhu očuvanja zdravlja ljudi, ali i životinja, sve je veći naglasak i na istraživanju pojavnosti BHAV infekcija u različitim vrsta životinja. HUBÁLEK, (1987a.), je opisao preživače (goveda, ovce i koze) kao prirodne domaćine BHAV-a te konje i pse kao i ostale sisavce u kojih je povremeno dokazana serokonverzija. Navedeni značaj u životinja dodatno naglašava činjenica da je virus prvi puta izoliran u koze, te da su zabilježeni brojni slučajevi oboljenja s razvojem neuroloških znakova upravo u preživača (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur, 2023.).

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti serokonverziju BHAV-a u kućnih ljubimaca (pasa i mačaka) kao životinja koje su u izrazito bliskom kontaktu s ljudima te, u slučaju dokaza navedenog, njihovu potencijalnu ulogu kao izvora infekcije i sentinel životinja za praćenje proširenosti virusa u urbanim sredinama. Osim javnozdravstvenog značaja, istraživanjem smo htjeli istražiti i pojavnost kliničkih znakova u životinja koje nisu opisane kao prirodni domaćini, prvenstveno pasa i mačaka, te potencijalne epizootiološke faktore koji u njih mogu utjecati na učestalost serokonverzije. Metoda izbora za provedbu istraživanja bio je virus neutralizacijski test kao do sada opisana dovoljno osjetljiva i specifična metoda (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur, 2023.). Istraživanjem smo dokazali serokonverziju za BHAV u kućnih ljubimaca na području Hrvatske. Seroprevalencija u pasa iznosila je 11,32%, što je u trenutku pisanja ovoga rada, najveća zabilježena seroprevalencija u kućnih ljubimaca.

Postoji više objašnjenja kojima možemo tumačiti razliku navedenih seroprevalencija između pasa i mačaka. Prva je različita izloženost vektorima između te dvije vrste. Psi su opisani kao životinje koje imaju veću sklonost invaziji krpeljima za razliku od mačaka (KRČMAR, 2019.), što može bit posljedica višeg kretanja u rizičnim područjima kao što su šume i livade. Jedan od nedostataka ovog istraživanja je nedostatak podataka o udjelu mačaka koje su imale pristup vanjskom okolišu te onih koje su držane isključivo kao unutarne životinje. No, neovisno o načinu držanja, podaci invazije krpeljima u mačaka su rijetki. Jedno istraživanje na razini Europe navodi kako je od ukupnih 29,6% invazije ektoparazitima u pretraživanoj populaciji mačaka tek 1,2% uzrokovano krpeljima, dok ostatak čine šugarci, buhe i ostali (BEUGNET i sur, 2014.). Navedena razlika invazije krpeljima, može biti i posljedica puno veće potrebe i mogućnosti mačaka za čišćenjem krzna u odnosu na pse. Drugi mogući razlog je različita vrsna prijemljivost ili imunološki odgovor. Malo je toga poznato o BHAV infekciji u životinja te je moguće da mačke uopće nisu prijemljive kao vrsta. Također, u istraživanju je korišten VN-test za dokaz protutijela. Ova metoda dokazuje samo prisutnost i titar neutralizirajućih protutijela te je moguće da mačke, za razliku od pasa, tijekom infekcije, ova protutijela ne stvaraju, ili stvaraju u izrazito niskim količinama. Za bolje razumijevanje razlika u imunosnom odgovoru pasa i mačaka prema BHAV-u, potrebno je dodatno istraživanje s većim brojem uzorkovanih mačaka s naglaskom na životinje koje sigurno imaju pristup vanjskom okolišu.

Nakon dokaza serokonverzije u pasa htjeli smo istražiti postoje li značajni epizootiološki faktori koji bi mogli doprinijeti infekciji u te vrste. U obzir smo uzeli

uobičajene čimbenike predispozicije kao što su pasmina, dob, spol, lokacija te pripadnost skloništima za nezbrinute životinje. Neovisno o pripadnosti određenoj pasminskoj skupini, dobi i spolu pretraživanih pasa, nije dokazan značajan utjecaj navedenih čimbenika na vjerojatnost pozitivnog serološkog rezultata. Nije dokazana značajna povezanost mjesta obitavanja životinja na seroprevalenciju, odnosno seroprevalencija pasa iz urbane sredine ili ruralnih područja se nije statistički značajno razlikovala. Time možemo zaključiti da su psi u ovom istraživanju neovisno o lokaciji imali podjednak rizik od infekcije BHAV-om. DE WAAL i suradnici (2020.), dokazali su da psi držani za potrebe rada i oni držani kao kućni ljubimci imaju slične mogućnosti invazije krpeljima. Navedenim su dokazali da životinje koje se ne udaljavaju značajno od kućanstava, isto podliježu velikom riziku dolaska u kontakt s vektorima, koji u ovom trenutku čine izvor infekcije. Obzirom na izostanak značajnosti navedenih epizootioloških čimbenika možemo zaključiti kako je trenutno najznačajniji čimbenik infekcije u pasa izloženost krpeljima kao vektoru BHAV-a. Ovo istraživanje ne obuhvaća podatke o zastupljenosti vektora i vektorskih vrsta na pretraživanoj populaciji, a moglo bi predstavljati značajan prostor za buduća istraživanja seroprevalencije BHAV-a u pasa te procjenu i određivanje učinkovitih profilaktičkih mjera. Zbog već opisane pojavnosti kliničkih znakova u preživača te dokaz infekcijskog sindroma i u imunokompetentnih ljudi, htjeli smo istražiti podliježu li psi kao vrsta razvoju bolesti i, ako da, o kakvom tijeku bolesti se radi. Struktura uzorka i velika količina različitih kliničkih znakova u našoj populaciji pasa otežali su provođenje statističke analize istoga. Opisano povećanje seroprevalencije u ljudi s neurološkim kliničkim znakovima nepoznate etiologije, potaknulo nas je da izdvojimo pse sa sličnom anamnezom i analiziramo povezanost seroprevalencije u tih životinja. Na temelju rezultata, u ovom trenutku, neurološke kliničke znakove pasa našeg uzorka, ne možemo pripisati infekciji BHAV-om. Kako se ovdje radi o dokazu protutijela, ograničenje istraživanja prikazanom u ovom radu je da je vjerojatnost dokaza protutijela u akutnoj fazi minimalna, te klinički znakovi akutne infekcije mogu biti neprepoznati. Isto tako, zbog velikog broja različitih kliničkih znakova pasa iz ovog istraživanja, statistička obrada je bila ograničena, te moguće očitovanje infekcije kliničkim znakovima od drugih organskih sustava ne može biti isključeno. Veći uzorak životinja s postojećim neurološkim i drugim kliničkim znakovima, i trenutnim akutnim infekcijskim sindromom, mogao bi pružiti bolje uvide u kliničko očitovanje bolesti ili govoriti u prilog subkliničke infekcije.

U posljednjih nekoliko godina, sve je veći naglasak na održavanje „Jednog zdravlja“, koji uključuje međusobnu povezanost zdravlja ljudi, domaćih i divljih životinja i okoliša. Sam princip, što se tiče zaraznih bolesti, temelji se na praćenju pojavnosti zarazne bolesti u jedne od navedenih skupina, kako bi se očuvalo zdravlje svih. Ovo istraživanje temeljilo se upravo na tom principu. Obzirom na prepoznatost *Bhanja bandavirusa* kao potencijalno značajnog patogena ljudi sada, i još više u budućnosti, prepoznali smo potrebu da se isto istraži u životinja. Dokazom serokonverzije u pasa možemo slobodno zaključiti da psi, kao životinjska vrsta koja je u bliskom kontaktu s ljudima, mogu značajno doprinijeti praćenju pojavnosti ovog uzročnika u urbanim sredinama te procjeni izloženost, odnosno rizik infekcije u ljudi. Praćenje infekcija u urbanim sredinama, koristeći sentinel životinja, značajan je izazov, jer se tradicionalno koriste farmske životinje. Njihova upotreba je temeljena na njihovoj brojnosti te lakoći dobivanja uzoraka. S druge strane, glavno ograničenje je njihova odsutnost u urbanim sredinama, te su rezultati ovog istraživanja od izuzetnog značaja. Buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena i na dokaz samog uzročnika. Potvrda aktivne infekcije u životinja koje obitavaju blizu ljudima svrstala bi te životinje u značajne rezervoare koji mogu doprinijeti širenju bolesti u ljudskoj populaciji. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na šire uzorkovanje kako pasa, tako i mačaka, iz različitih dijelova Hrvatske, uključujući ruralna i druga gradska područja, kako bi se bolje razumjela epizootiologija BHAV-a.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđena seroprevalencija *Bhanja Bandavirusa* (BHAV) kod pasa u Hrvatskoj iznosi 11,32%, dok kod mačaka nije bilo seropozitivnih uzoraka.
2. Rezultati ukazuju na aktivnu cirkulaciju BHAV-a u urbanim sredinama Hrvatske te se psi mogu koristiti kao sentinel životinje.
3. Psi su podložniji infekciji od mačaka ili zbog vrsne prijemljivosti ili zbog češće izloženosti krpeljima.
4. Nije utvrđena značajna povezanost između seropozitivnosti i dobi, spola, pasmine ili mjesta boravka pasa.
5. Nije utvrđena povezanost infekcije pasa BHAV i pojave neuroloških kliničkih znakova, svojstvenih kliničkoj slici u ljudi.
6. Daljnja istraživanja na širem uzorku mačaka i pasa potrebna su za bolje razumijevanje epidemiologije BHAV-a u Hrvatskoj.

## 7. LITERATURA

BEUGNET F., P. BOURDEAU, K. CHALVET-MONFRAY, V. COZMA, R. FARKAS, J. GUILLOT, L. HALOS, A. JOACHIM, B. LOSSON, G. MIRÓ, D. OTRANTO, M. RENAUD, L. RINALDI (2014): Parasites of domestic owned cats in Europe: co-infestations and risk factors. *Parasites Vectors*. 7, 1-13.

CALISHER C. H., H. C. GOODPASTURE (1975): Human infection with *Bhanja* virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 1040-1042.

CDC (2024): Arbovirus Catalog, Virus: Bhanja (BHAV) [ArboCat Virus: Bhanja \(BHAV\) \(cdc.gov\)](https://www.cdc.gov/arbovirus/collections/catalog/index.html) (01.08.2024).

DANDAWATE, C. N., P. K. RAJAGOPALAN, K. M. PAVRI, T. H. WORK (1969): Virus isolations from mosquitoes collected in North Arcot district, Madras State, and Chittoor district, Andhra Pradesh between November 1955 and October 1957. *Indian J. Med. Res.* 57, 643-650.

DE WAAL T., A. LAWLOR, A. ZINTL, B. COWLEY, A. BAGHA (2020): A Survey of Ticks Infesting Dogs and Cats in Ireland. *Animals*. 10, 1404.

DILCHER M., M. J. ALVES (2012): Genetic characterization of Bhanja virus and Palma virus, two tick-borne phleboviruses. *Virus Genes*. 45, 311-315.

EDER, M., F. CORTES, N. TEIXEIRA DE SIQUEIRA FILHA, G. V. ARAÚJO DE FRANÇA, S. DEGROOTE, C. BRAGA, V. RIDDE, C.M. TURCHI MARTELLI (2018): Scoping review on vector-borne diseases in urban areas: transmission dynamics, vectorial capacity and co-infection. *Infect. Dis. Poverty*. 7, 1-24.

EFSA (2024): Bhanja virus infection [Bhanja virus infection \(europa.eu\)](https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/6422/abstract) (01.08.2024).

ESTRADA-PEÑA A., M. PFÄFFLE, G. BANETH, G. KLEINERMAN, T. N. PETNEY (2017): *Ixodoidea* of the Western Palaearctic: A review of available literature for identification of species. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 512-525.

HUBÁLEK, Z. (1986): Modulation of Bhanja virus infection in mice. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A*. 262, 417-424.



HUBÁLEK, Z. (1987a): Experimental Pathogenicity of *Bhanja* Virus. Zbl. Bakt. Hyg. A. 266, 284-291.

HUBÁLEK, Z. (1987b): Geographic Distribution of *Bhanja* virus. Folia Parasitol. 34, 77-86.

HUBÁLEK, Z. (2010a): Biogeography of tick-borne *Bhanja* virus (*bunyaviridae*) in Europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 10, 372691

ICTV (2011): Family: *Bunyaviridae*  
[https://ictv.global/report\\_9th/RNANeg/Bunyaviridae](https://ictv.global/report_9th/RNANeg/Bunyaviridae) (27.07.2024)

ICTV (2023): Taxon Details, Species: *Bandavirus bhanjanagarensis*  
[https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202307635&taxon\\_name=Bandavirus%20bhanjanagarensis](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202307635&taxon_name=Bandavirus%20bhanjanagarensis) (03.08.2024)

ICTV (2024): Family: *Phenuiviridae*, Genus: *Bandavirus*.  
<https://ictv.global/report/chapter/phenuiviridae/phenuiviridae/bandavirus> (27.07.2024)

KLOBUČAR A., I. LIPOVAC, N. ŽAGAR, S. MITROVIĆ- HAMZIĆ, V. TEŠIĆ, T. VILIBIĆ- ČAVLEK, E. MERDIĆ (2019): First record and spreading of the invasive mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in Croatia. Med. Vet. Entomol. 33, 171- 176.

KRČMAR S. (2012): Hard ticks (*Acari, Ixodidae*) of Croatia. Zookeys. 234, 19-57.

KRČMAR, S. (2019): Diversity, ecology, and seasonality of hard ticks (*Acari: Ixodidae*) in eastern Croatia. J. Vector Ecol. 44, 18- 29.

MÁDR V., Z. HUBÁLEK, D. ZENDULKOVÁ (1984): EXPERIMENTAL INFECTION OF SHEEP WITH *BHANJA* VIRUS. Folia Parasitol. 31, 79-84.

MARIN, M. S., J. MCKENZIE, G. F. GAO, H. W. REITH, A. ANTONIADIS, E. A. GOULD (1995): The virus causing encephalomyelitis in sheep in Spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. Res. Vet. Sci. 58, 11-13.

MATSUNO K., C. WEISEND, A. P. TRAVASSOS DA ROSA, S. L. ANZICK, E. DAHLSTROM, S. F. PORCELLA, D. W. DORWARD, X. J. YU, R. B. TESH, H. EBIHARA (2013): Characterization of the *Bhanja* serogroup viruses (*Bunyaviridae*): a

novel species of the genus Phlebovirus and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. *J. Virol.* 87, 3719-3728.

NICHOL, S. T., B. J. BEATY, R. M. ELLIOT, R. W. GOLDBACH, A. PLYUSNIN (2005): The Bunyaviridae. U: In *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. Str. 695- 716.

PAVLOV, P., B. ROSICKÝ, Z. HUBÁLEK, M. DANIEL, V. BÁRDOS, J. MINÁR, Z. JURICOVÁ (1978): Isolation of *Bhanja* virus from ticks of the genus *Haemaphysalis* in southeast Bulgaria and presence of antibodies in pastured sheep. *Folia Parasitol.* 25, 67-73.

PFÄFFLE, M. P., M. MADDER, M. M. SANTOS-SILVA, T. N. PETNEY (2017): *Ixodes frontalis* (Panzer, 1798) (Figs. 26–28). U: *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. Str. 91- 96.

PLYUSNIN, A., B. J. BEATY, R. M. ELLIOTT, R. GOLDBACH, R. KORMELINK, Å. LUNDKVIST (2011): *Bunyaviridae*. In *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Sci. Publ. Co. Str 725- 741.

PUNDA V., I. BEUS, C. H. CALISHER, J. VESENJAK-HIRJAN (1980): Laboratory infections with *Bhanja* virus. *Zentralbl. Bakteriol.* 9, 273–275.

PUNDA V., J. VESENJAK- HIRJAN (1986): *Bhanja* virus in Croatia. *Mikrobiol. (Beogr.)*. 23, 169- 175.

SANTINI M., T. VILIBIĆ- ČAVLEK, B. BARŠIĆ, L. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ, 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.

SHAH K. V., T. H. WORK (1969): *Bhanja* virus: a new *arbovirus* from ticks *Haemaphysalis intermedia* Warburton and Nuttall, 1909, in Orissa, India. *Ind. J. Med. Res.* 57, 793-798.

VESENJAK- HIRJAN J., C. H. CALISHER, Z. BRUDNJAK, D. TOVORNIK, N. SKRTIĆ, J. S. LAZUICK (1977): Isolation of *Bhanja* virus from ticks in Yugoslavia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 1003- 1008.

VESENJAK-HIRJAN, J., C. H. CALISHER, I. BEUS, E. MARTON (1980): First natural clinical human *Bhanja* virus infection. *Zentralbl. Bakteriol.* 9, 297-301

VESENJAK-HIRJAN J., V. PUNDA-POLIĆ, M. DOBE (1991): Geographical distribution of *arboviruses* in Yugoslavia. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 35, 129-140.

VILIBIĆ-ČAVLEK, T. (2018): Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvasivnih *arbovirusnih* infekcija na području Hrvatske u 2017/2018. godini. Radionica s međunarodnim sudjelovanjem "Emergentne i zapostavljene zoonoze u kontekstu "jednog zdravlja"", 18- 19 Listopad, Zagreb, Hrvatska, str. 8-9.

VILIBIĆ-ČAVLEK, T., V. STEVANOVIĆ, S. KRČMAR, V. SAVIĆ, S. KOVAČ, M. BOGDANIĆ, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, D. SABADI, M. SANTINI, T. POTOČNIK-HUNJADI, M. AL-MUFLEH, LJ. BARBIĆ (2023): Detection of *Bhanja Bandavirus* in Patients with Neuroinvasive Disease of Unknown Etiology in Croatia. Microorganisms. 11, 2155.

ZANOTTO, P. M. A., G. F. GAO, T. GRITSUN, M. S. MARIN, W. R. JIANG, K. VENUGOPAL, H. W. REID, E. A. GOULD (1995): An arbovirus cline across the northern hemisphere. Virol. 210, 152- 159.

WARD, M. A., L. M. ENGLISH, H. G. KINZER (2017): Guide for Control of External Parasites of Sheep and Goats. New Mexico State University. [https://pubs.nmsu.edu/\\_b/B112/](https://pubs.nmsu.edu/_b/B112/) (08.08.)

## 8. SAŽETAK

### PREVALENCIJA NEUTRALIZACIJSKIH PROTUTIJELA ZA *BANDAVIRUS BHANJANAGARENSE* U PASA I MAČAKA ZAPRIMLJENIH NA KLINIKE VETERINARSKOG FAKULTETA SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Elena Kovačić- Gregov

Ovo istraživanje ispituje prisutnost neutralizacijskih protutijela na *Bandavirus bhanjanagarensis* (BHAV) kod pasa i mačaka u Hrvatskoj, s posebnim fokusom na potencijalne epidemiološke rizike i javnozdravstvene posljedice. Analizirano je ukupno 159 uzoraka seruma pasa i 55 mačaka prikupljenih na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Rezultati su pokazali seroprevalenciju BHAV-a kod pasa od 11,32%, dok kod mačaka nije zabilježen niti jedan pozitivan slučaj. Statističkom analizom nije pronađena značajna povezanost između seropozitivnosti i varijabli poput dobi, spola, pasmine, prebivališta, ili mjesta boravka (domaćinstvo ili sklonište). Psi su pokazali veću osjetljivost na infekciju BHAV-om u usporedbi s mačkama, što je možda povezano s većom izloženošću krpeljima, glavnim prijenosnicima virusa. Prisutnost neutralizacijskih protutijela kod pasa ukazuje na aktivnu cirkulaciju virusa u urbanim sredinama Hrvatske, što predstavlja potencijalni rizik za prijenos virusa na ljude, osobito u područjima s visokom populacijom krpelja. Ovi nalazi naglašavaju važnost daljnjih istraživanja i preventivnih mjera kako bi se smanjio rizik za zdravlje ljudi i životinja. Iako je seroprevalencija BHAV-a kod mačaka bila 0%, potrebno je dodatno istražiti ove životinje, osobito one iz različitih geografskih područja i okolišnih uvjeta, kako bi se bolje razumio njihov potencijalni epidemiološki značaj u širenju virusa. Rezultati naglašavaju važnost daljnjeg praćenja BHAV-a kod domaćih životinja radi bolje kontrole infekcije i zaštite javnog zdravlja. Buduća istraživanja trebala bi uključiti veći uzorak mačaka i pasa iz različitih regija Hrvatske, uključujući i ruralne i urbane zone, kako bi se pružio sveobuhvatan pregled epidemiologije ovog zoonotskog virusa i njegovih javnozdravstvenih rizika.

Ključne riječi: *Bandavirus bhanjanagarensis* (BHAV), seroprevalencija, epidemiološki rizici, neutralizacijska protutijela, krpelji - prijenosnici virusa

## 9. SUMMARY

### *PREVALENCE OF NEUTRALIZING ANTIBODIES FOR BHANJANAGARENSE BANDAVIRUS IN DOGS AND CATS ADMITTED TO THE CLINICS OF THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF ZAGREB*

Elena Kovačić- Gregov

*This study examines the presence of neutralising antibodies against the Bhanja Bandavirus (BHAV) in dogs and cats in Croatia, focusing on potential epidemiological risks and public health impacts. A total of 159 dog serum samples and 55 cat samples were analyzed and collected at the Veterinary Faculty in Zagreb. Results showed a BHAV seroprevalence of 11.32% in dogs, while no positive cases were found in cats. Statistical analysis revealed no significant association between seropositivity and variables such as age, gender, breed, residence, or living conditions (household or shelter). Dogs were more susceptible to BHAV infection than cats, likely due to increased exposure to ticks, the primary virus vectors. The presence of neutralising antibodies in dogs suggests active virus circulation in urban areas of Croatia, posing a potential risk of transmission to humans, particularly in regions with high tick populations. These findings highlight the need for further research and preventive measures to reduce animal and human health risks. Although BHAV seroprevalence in cats was 0%, further investigation is needed, particularly in different geographical areas and environmental conditions, to understand better their potential epidemiological role in virus spread. The results emphasise the importance of continued monitoring of BHAV in domestic animals to improve infection control and protect public health. Future studies should include a larger sample of cats and dogs from various regions of Croatia, including rural and urban zones, to provide a comprehensive overview of the epidemiology of this zoonotic virus and its public health risks.*

*Keywords: Bandavirus bhanjanagarensis (BHAV), seroprevalence, epidemiological risks, neutralising antibodies, tick-borne virus transmission.*

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 09.02.1998., u Bjelovaru. Pohađala sam osnovnu školu Mate Lovraka u Velikom Grđevcu, nakon čega upisujem srednju školu Gimnazija Daruvar. Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine. Tijekom studija se bavim raznim studentskim poslovima, volontiranjem na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta, sudjelujem u studentskim organizacijama, te pohađam brojne kongrese. Na Klinici za unutarnje bolesti stječem znanje i iskustvo u dijagnostici i liječenju unutarnjih bolesti kućnih ljubimaca. Dodatno znanje u području kirurškog šivanja stekla sam kroz program VetSuture na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za diplomski rad odabirem Kliniku za zarazne bolesti i izv. prof. dr. sc. Vladimira Stevanovića, kao mentora za diplomski rad na temu *Bandavirus bhanjanagarensis*, zbog velikog interesa za istraživanje zoonotskih bolesti i njihovog utjecaja na javno zdravlje. Na klinici dobivam mogućnost rada s vrhunskim stručnjacima i veliku količinu znanja o serološkim metodama i zaraznim bolestima. Obaveznu veterinarsku praksu odrađujem u Veterinarskoj stanici Grada Zagreba.