

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Keti Kovačević

**ODREĐIVANJE SEROPREVALENCIJE I  
VALIDACIJA SEROLOŠKIH METODA  
DIJAGNOSTIKE INFLUENCE KONJA U  
KONTINENTALNOJ HRVATSKOJ**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

**Predstojnik:** prof. dr. sc. Zoran Milas

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ljubo Barbić

**Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. Prof. dr. sc. Zoran Milas
2. Doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
3. Izv. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
4. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina (zamjena)

*Zahvaljujem se prije svega svome mentoru, izv. prof. dr. sc. Ljubi Barbiću, na vođenju, korisnim savjetima i strpljenju tijekom provođenja istraživanja i pomoći u oblikovanju ovog rada.*

*Veliko hvala dr. sc. Snježani Kovač za neizmjernu pomoć u izvođenju praktičnog dijela ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem se i dr. sc. Vladimiru Stevanoviću za konstruktivne rasprave tijekom provođenja istraživanja i kritičkog čitanja konačne verzije napisanog rada.*

*Također se zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima za sva odricanja, razumijevanje i najveću podršku i potporu tijekom svih godina studija i tijekom izrade diplomskog rada, jer bez njih niti ovo ne bi bilo moguće.*

## **Popis kratica**

**EIV** – Virus influence konja (eng. *Equine influenza virus*)

**EI** – Influenca konja (eng. *Equine influenza*)

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**HA** – hemaglutinin

**NA** – neuraminidaza

**RT-PCR** – lančana reakcija polimeraze s prethodnom reverznom transkripcijom

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

**IHA** – inhibicija hemaglutinacije (eng. *Hemagglutination inhibition*)

**SRH** – jednosmjerna radijalna hemoliza (engl. *Single radial haemolysis*)

**NP** – nukleoprotein virusa influence

**RH** – Republika Hrvatska

**OIE** – Svjetska organizacija za zdravlje životinja (eng. *World Organisation for Animal Health*)

## **Popis tablica**

**Tablica 1.** Seroprevalencija influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj određena ELISA metodom

**Tablica 2.** Usporedni rezultati pretraživanja seruma konja s ELISA testom i IHA

**Tablica 3.** Određivanje specifičnosti i osjetljivosti, prediktivnih vrijednosti i podudarnosti rezultata ELISA testa u odnosu na rezultate IHA ovisno o promjeni granične vrijednosti interpretacije pozitivnih rezultata

**Tablica 4.** Rezultati određivanja titra specifičnih protutijela metodom IHA i rezultata ELISA metodom

## **Popis slika**

**Slika 1.** Izvođenje ELISA serološke metode za dijagnostiku influence konja

**Slika 2.** Izvođenje serološke metode IHA za dijagnostiku influence konja

**Slika 3.** Seroprevalencija influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj

**Slika 4.** Broj životinja s očitom pojedinačnom vrijednošću titra protutijela metodom IHA

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja .....	2
3. Materijal i metode .....	5
4. Rezultati.....	9
5. Rasprava .....	15
6. Zaključci.....	19
7. Literatura .....	20
8. Sažetak.....	24
9. Summary.....	25
10. Životopis.....	26

## 1. UVOD

Istraživanja proširenosti infekcija virusom influence konja na području RH provedena su nekoliko puta na ograničenim područjima, međutim većina istraživanja provedena je u prošlom stoljeću, a samo jedno vrlo ograničeno istraživanje je provedeno u 21. stoljeću, prije više od 10 godina. S druge strane višekratno su bilježene epizootije dišnih oboljenja konja, zaključno s velikom epizootijom influence konja 2015. godine. Stoga je opći cilj istraživanja bio ustanoviti seroprevalenciju influence konja na području cijele kontinentalne Hrvatske kako bi po prvi put imali cjelovite podatke o proširenosti i stvarnom značaju ove bolesti konja u trenutnim epizootiološkim prilikama RH.

Specifični cilj rad bio je ustanoviti razlike u seroprevalenciji influence konja u različitim županijama kontinentalne Hrvatske. Nadalje, specifični cilj je bio i istražiti mogućnost i opravdanost korištenja imunoenzimnog dijagnostičkog testa koji omogućuje razlikovanje cijepljenih od inficiranih životinja, određivanjem njegove specifičnosti i osjetljivosti u odnosu na referentnu dijagnostičku metodu (IHA). Usporedbom rezultata navedenih metoda također smo procjenjivali i cjepni obuhvat influence konja na području kontinentalne Hrvatske.

Realizacijom navedenih ciljeva istraživanja željeli smo znanstveno utemeljeno odrediti opravdanosti i potrebu za uvođenjem sustava nadzora kao i odrediti smjernice za provođenje programa nadzora EI uvažavajući trenutnu proširenost i epizootiološke specifičnosti konjogojstva u RH.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Influenca konja (EI) je zarazna bolest kopitara uzrokovana virusom influence konja (EIV). Ova bolest je najznačajnija akutna respiratorna bolesti konja zbog eksplozivnog širenja i izrazite kontagioznosti što rezultira oboljenjem velikog broja životinja te posljedično značajnim gospodarskim gubicima. Uzročnik bolesti pripada porodici *Orthomyxoviridae*, rodu *Influenzavirus A* (WEBSTER i sur., 1992.; WILSON, 1993.; VAN MAANEN i CULLINANE, 2002.). Bolest je prisutna širom svijeta, a do današnjeg dana nije dokazana jedino na Islandu i Novom Zelandu (VAN MAANEN i CULLINANE, 2002.; COWLED i sur., 2009.). EIV pripada skupini RNK virusa, veličine je 80–120 nm, kuglastog oblika te iskazuje svojstva pleomorfizma. Sadržava lipidnu ovojniciu u koju su ugrađeni glikoproteini hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA), formirajući 500 radijalno položenih izdanaka, koji su najznačajniji virusni antigeni za imunološki odgovor tijekom infekcije. Ulazak virusa u stanicu domaćina omogućava HA, vezanjem na receptore salicilne kiseline na staničnoj membrani te na taj način uzrokuje spajanje virusne ovojnice s membranom stanice domaćina (SKEHEL i WILEY, 2000.). Otpuštanje virusnih čestica iz inficiranih stanica omogućuje NA cijepajući vezu sa salicilnom kiselinom, a smatra se da ima i ulogu u ulasku virusa u stanicu olakšavajući mu prodiranje kroz sluznicu dišnog sustava (SETO i ROTT, 1966.; MATROSOVICH i sur., 2004.). Temeljem tipizacije navedenih glikoproteina ovojnice, provodi se tipizacija virusa influence općenito, a EIV se svrstava u dva podtipa H7N7 (A/equine/1) i H3N8 (A/equine/2). Hemaglutinin je izrazito sklon promjeni u antigenskoj strukturi što omogućava virusu antigensko skretanje te izbjegavanje imunološkog odgovora zbog čega je provođenje imunoprofilakse značajno otežano (LAMB i KRUG, 2001.).

EIV u dišni sustav ulazi sitnim česticama aerosola, umnaža se u epitelu sluznice i uzrokuje patološke promjene po cijelom dišnom sustavu, a ponajviše u donjim dišnim prohodima. Umnažanje virusa dovodi do smrti stanica uslijed apoptoze, s posljedičnom deskvamacijom epitela, čime sluznica dišnog sustava postaje predisponirana za razvoj sekundarnih bakterijskih infekcija. S histološkog aspekta uočavamo vakuolizaciju i oteknuće trepetljikavih stanica s gubitkom trepetljika (DONELAN i sur., 2003.; KRUG i sur., 2003.). Inkubacijsko razdoblje može biti kraće od 24 sata, a u djelomično imunih cijepljenih životinja ono je produljeno. Značajno je naglasiti da se tijekom infekcije pojavljuje i inkubacijsko kliconoštvo koje je izrazit problem u nadzoru širenja bolesti. Klinička slika počinje naglim porastom temperature, ponekad i iznad 41° C, seroznim iscjetkom iz nosa koji za 96 sati postaje mukopurulentan te učestalim i suhim kašljem. Oboljele životinje pokazuju simptome



ubrzanog disanja i ubrzane frekvencije bila, nakon čega slijedi letargija i anoreksija različitog stupnja. Uz navedenu tipičnu kliničku sliku influence konja, zabilježeni su i drugi klinički znakovi, bronhopneumonija, miozitis, miokarditis, edem nogu te iznimno encefalitis. Morbiditet je gotovo 100% u populacijama neimunih jedinki. Mortalitet je uobičajeno nizak, iako infekcija u prvim danima života često ima smrtonosan ishod (COGGINS, 1979.).

Objektivna dijagnostika EIV moguća je izdvajanjem virusa, zatim molekularnim i serološkim metoda. Virus se izdvaja na embrioniranim kokošjim jajima ili staničnim kulturama. Kao uzorak za izdvajanje virusa najbolje je uzeti obrisak ili ispirak nosa unutar 48 sati od prvih zabilježenih kliničkih znakova. Embrionirano kokošje jaje u koje inokuliramo uzorak treba biti staro od 10 do 12 dana od oplodnje. Nedostatak ove metoda je taj što zahtijeva minimalno 2 do 3 dana za provedbu te nije potpuno pouzdana kod blagih i supkliničkih infekcija. Alternativa je izdvajanje EIV na staničnim kulturama za što se najčešće koriste linijske stanične kulture MDCK (epitelne stanice bubrega), MvILu (epitelne stanice pluća) i fibroblasti pilećeg embrija (ANONIMNO, 2015.a). Lančana reakcija polimerazom s prethodnom reverznom transkripcijom (RT-PCR) je visoko specifična i osjetljiva molekularna metoda dijagnostike koja omogućuje umnažanje određenih dijelova virusnog genoma pomoću specifičnih početnica djelovanjem enzima polimeraze. Uz izrazito brzo postizanje rezultata i visoku osjetljivost, nedostaci RT-PCR metode su moguća lažno pozitivni rezultati koji se mogu pojaviti uslijed kontaminacije prethodno pretraživanim materijalom, te zahtjevnost i relativno visoka cijena izvedbe (HERRMANN i sur., 2001.).

U dijagnostici influence konja ipak se najviše koriste serološke metode dijagnostike. Opisano je korištenje različitih metoda serološke dijagnostike, ali referentne metode su inhibicija hemaglutinacije (IHA) i jednosmjerna radijalna hemoliza (SRH), dok se u novije vrijeme sve više koriste različite inačice imunoenzimnog testa (ELISA) (KIRKLAND i DELBRIDGE, 2011.; ANONIMNO, 2015.a). Za određivanje seroprevalencije često se koristi upravo ELISA-a metoda iz razloga što je izvođenje testa brzo, jednostavno i djelom automatizirano, te se može pretražiti značajno veći broj uzoraka u odnosu na metodu IHA i SRH (KITTELBERGER i sur., 2011.; READ i sur., 2012.). Uz navedeno, u novije vrijeme razvijena je ELISA metoda u kojoj se kao antigen koristi nukleoprotein (NP) virusa influence koji nastaje tijekom infekcije. Ova metoda je značajna jer ne detektira protutijela nastala cijepljenjem sve proširenijim vektorskim rekombinantnim cjepivom te u populacijama u kojima se primjenjuje omogućuje razlikovanje inficiranih od cijepljenih životinja (GALVIN i sur., 2013.). Na ovaj način moguće je, uz istovremeno pretraživanje IHA, odrediti i cjepni

obuhvat u populaciji jer pretraživanjem životinja cijepljenih vektorskim rekombinantnim cjepivom nalazimo pozitivan nalaz IHA, s obzirom da cjepivo potiče tvorbu specifičnih protutijela na HA, uz istovremeno negativan nalaz ELISA-om koja otkriva protutijela za NP.

Influenca konja je zbog visokih izravnih i neizravnih gospodarskih šteta najznačajnija zarazna bolest dišnog sustava kopitara. Stoga je njen sustavan nadzor i sprječavanje širenja, primarno provođenjem imunoprofilakse, osnovna djelatnost veterinarske struke u državama s razvijenim konjogojstvom.

Prvi serološki dokaz infekcija virusom influence konja na području Republike Hrvatske (RH) datira iz 1967. godine (CVETNIĆ i sur., 1967.), a samo godinu kasnije po prvi puta je i izdvojen virus influence konja podtip H3N8 (CVETNIĆ i sur., 1970.). Seroprevalencija je određivana 1971. i 1972. godine i iznosila je 9,13% za podtip H3N8, odnosno 8,69% za podtip H7N7 (JUKIĆ, 1972.). Podtip H7N7 izdvojen je prvi put na području RH 1974. godine (CVETNIĆ i MAYER, 1974.). Sljedeći opis istraživanja seroprevalencije EI na području RH datira iz 1976. godine kada je ustanovljena seroprevalencija od 24,5% za podtip H3N8 i 7,2% za podtip H7N7 (ČAČ i CVETNIĆ, 1976.). Nakon ovog razdoblja intenzivnih istraživanja slijedi dulje razdoblje bez podataka o proširenosti influence konja, sve do 1984. godine kada je seroprevalencija za podtip H3N8 iznosila 15,39%, a H7N7 6,80% (MADIĆ, 1984.). Na žalost, nadzor influence konja se u predstojećim godinama na području RH gotovo i ne provodi tako da je u sljedećih 30-ak godina jedino opisano istraživanja na ograničenom prostoru 1996. godine (MADIĆ i sur., 1996.) te jedna epizootija bolesti 2004. godine (BARBIĆ i sur., 2009.). Sukladno navedenome, iako je u RH uočljiv značajan porast broja konja i razvoj konjogojstva u posljednjih 20-ak godina, dulje od desetljeća ne postoje nikakvi znanstveni podaci o proširenosti influence konja, a sustavan nadzor ove najznačajnije zarazne bolesti dišnih prohoda kopitara nikada nije niti uveden.

Imunoprofilaksa EI na području RH provodi se samo na zahtjev vlasnika, bez zakonske obveze, tako da je cjepni obuhvat posve nepoznat. Potpuni izostanak sustavnog nadzora bolesti i potpuno nepoznati epizootiološki podaci, kao i nepostojanje sustavnog provođenja imunoprofilakse, omogućuju nesmetano širenje ove izrazito kontagiozne i značajne bolesti na području RH. Ovo se na žalost i potvrdilo izbijanjem velike epizootije bolesti 2015. godine na području kontinentalne Hrvatske potvrđene od strane Ministarstva poljoprivrede RH (ANONIMNO, 2015.b).

### 3. MATERIJAL I METODE

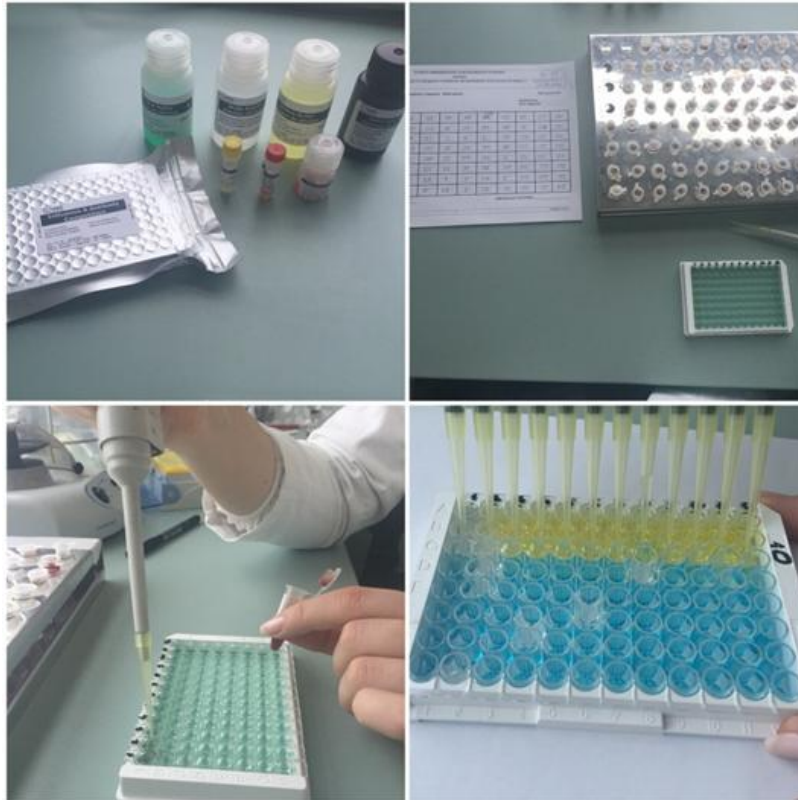
U istraživanju je pretraženo ukupno 1180 seruma konja podrijetlom od životinja koje borave na području 14 županija kontinentalne Hrvatske. Zbog poteškoća u razgraničavanju životinja koje borave na području Grada Zagreba i Zagrebačke županije ove dvije županije su pretraživane kao jedinstveno područje te su na taj način i analizirani podaci.

Pretraživani uzorci odabrani su metodom nasumičnog odabira između seruma dostavljenih u okviru provedbe programa nadzora Bolesti Zapadnog Nila u Laboratoriji za virusni arteritis konja - ARTER.lab, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odabir seruma za istraživanje načinjen je između dostavljenih uzoraka uvažavajući kriterij da su dostavljeni nakon 15. srpnja 2015. godine. Ovaj način odabira određen je kako bi rezultati predstavljali epizootiološku situaciju nakon epizootije influence konja koja je zabilježena krajem ožujka i početkom travnja 2015. godine. Svi serumi korišteni u istraživanju dobiveni su odvajanjem seruma iz pune krvi postupkom centrifugiranja pri 4000 okretaja tijekom 10 minuta nakon čega su otočeni u eppendorf epruvete te pohranjeni pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do izvođenja pretraga.

Svih 1180 nasumično odabranih seruma pretraženi su u svrhu određivanja seroprevalencije influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj komercijalnim imunoenzimnim (ELISA) kompletom ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species (ID.vet, Grables, Francuska) sukladno uputi proizvođača. Odabir navedenog dijagnostičkog kompleta za provođenje istraživanja načinjen je zbog toga što se u njegovoj proizvodnji kao antigen na mikrotitracijske plitice veže nukleoprotein (NP) virusa influence te rezultati omogućavaju razlikovanje protutijela nastalih nakon infekcije od onih nastalih kao posljedica cijepljenja vektorskim rekombinantnim cjepivima ProteqFlu ili ProteqFlu TE (Merial, Lyon, Francuska), koja se koriste na području RH. Korišteni test je izrađen na principu kompetitivne ELISA-e.

Tijekom izvedbe metode, za ispiranje mikrotitracijskih plitica korišten je uređaj za automatsko ispiranje mikrotitracijskih plitica HydroFlex microplate washer (Tecan, Männedorf, Švicarska). Rezultati su očitavani temeljem određivanja optičke gustoće u svakoj jažici mikrotitracijske plitice s dodanim pretraživanim serumom, pri valnoj duljini od 450 nm, pomoću automatskog čitača Sunrise™ (Tecan, Männedorf, Švicarska). Rezultati pretraživanja su interpretirani sukladno uputi proizvođača, kao omjer optičke gustoće pretraživanog seruma i negativnog kontrolnog seruma koji je sastavni dio dijagnostičkog kompleta. Kako se rezultat izražava u postotku, dobiveni omjer je pomnožen sa 100. Pretraživani serumi za koje je na

navedeni način izračunati rezultat bio veći ili jednak 50% smatrani su negativnim. Serumi za koje je izračunata vrijednost bila manja ili jednaka 45% interpretirani su kao pozitivni, a serumi s omjerom optičke gustoće u odnosu na negativni kontrolni serum između 45% i 50% smatrani su sumnjivim (Slika 1.).

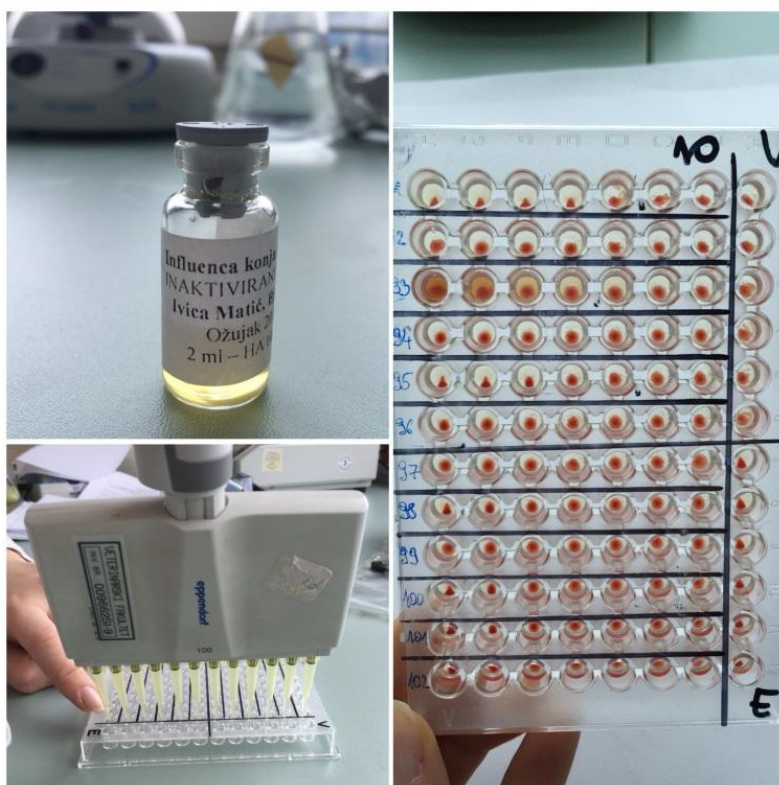


**Slika 1.** Izvođenje ELISA serološke metode za dijagnostiku influence konja

U svrhu određivanja specifičnosti i osjetljivosti korištenog ELISA kompleta, nasumičnim odabirom odabrano je 196 seruma prethodno pretraženih ELISA metodom od kojih je 127 bilo pozitivnih, 11 sumnjivih i 58 negativnih. Odabrani serumi su pretraženi metodom inhibicije hemaglutinacije (IHA), referentnom metodom za serološku dijagnostiku influence konja. Izvedba metode IHA je načinjena sukladno opisu postupka od strane Svjetske organizacije za zdravlje životinja – OIE (ANONIMNO, 2015.a).

Ukratko, u serumima pretraživanim IHA su prije pretraživanja uklonjeni nespecifični inhibitori hemaglutinacije obradom seruma kalijevim periodatom ( $KIO_4$ ) i zagrijavanjem u vodenoj kupelji pri  $56^\circ C$  tijekom 30 minuta, sukladno preporuci navedenoj od strane OIE-a.

Kao antigen korišten je virus influence konja A/equi/Croatia/2015, izdvojen tijekom epizootije bolesti 2015. godine na području RH radi homolognosti s očekivanim protutijelima u pretraživanim serumima. Korišteni virus je izdvojen na embrioniranim kokošjim jajima te pomoću antiseruma i molekularno tipiziran kao H3N8. Za izvedbu pretrage, sukladno standardnom postupku izvođenja IHA, virus je prije izvođenja pretrage titriran te korišten u titru od 4 hemaglutinacijske jedinice. Uz, na navedeni način prethodno pripremljene serume i titrirani antigen, u izvedbi pretrage korišteni su i kokošji eritrociti u obliku 1% suspenzije u fosfatnom puferu (PBS). Kako je početno razrjeđenje u izvedbi IHA bilo 1:8, svi pretraživani serumi za koje u razrjeđenjima većim ili jednakim 1:8 nije došlo do aglutinacije eritrocita smatrani su pozitivnim, a serumi za koje je aglutinacija eritrocita bila uočljiva već u početnom razrjeđenju pretraživanog seruma 1:8 negativni. Titar protutijela pozitivnih seruma određen je kao najveće razrjeđenje seruma u kojima još uvijek izostaje hemaglutinacija kokošjih eritrocita (Slika 2.).



**Slika 2.** Izvođenje serološke metode IHA za dijagnostiku influence konja

Postignuti rezultati serološkog pretraživanja 1080 uzoraka seruma kopitara s područja kontinentalne Hrvatske ELISA metodom obrađeni su standardnim statističkim metodama u svrhu određivanja seroprevalencije na području cjelovite kontinentalne Hrvatske kao i po pojedinim županijama. U svrhu određivanja značajnosti razlika u rezultatima seroprevalencije za pojedinu županiju u odnosu na seroprevalenciju kontinentalne Hrvatske korišten je hi kvadrat test ili Fisherov egzaktni test (FISHER, 1922.) zbog malog broja pozitivnih uzoraka u pojedinim županijama. Statistički značajnim smatrala se razlika pri kojoj je vrijednost p bila  $< 0,05$ .

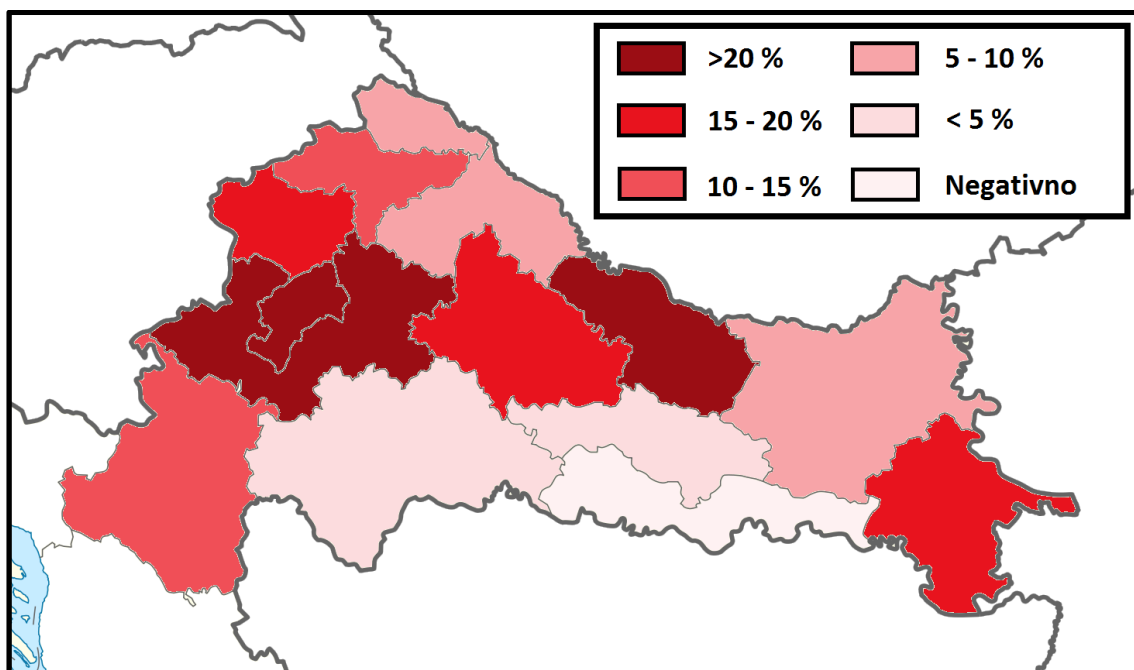
Određivanje specifičnosti i osjetljivosti korištenog dijagnostičkog ELISA kompleta u odnosu na referentnu metodu IHA načinjeno je uporabom statističkog računalnog programskog paketa za validaciju dijagnostičkih testova MedCalc za Windows, verzija 16.2.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgija) slobodno dostupnog na mrežnoj stranici [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Kako u validaciji dijagnostičkih testova ne možemo koristiti rezultate interpretirane kao sumnjive nego moraju biti ili pozitivni ili negativni, specifičnost i osjetljivost ELISA testa je izračunavana uz definiranje granične vrijednosti za interpretaciju pozitivnih rezultata na  $\leq 45\%$  i  $\leq 50\%$  čime smo određivali i utjecaj različitih graničnih vrijednosti na osjetljivost i specifičnost korištenog dijagnostičkog kompleta. Podudarnost između rezultata serološkog pretraživanja istih seruma ELISA metodom i IHA određena je izračunavanjem Kappa vrijednosti računalnim programom GraphPad Prism version 5.00 za Windows, (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) slobodno dostupnim na mrežnoj stranici <http://graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm>.

## 4. REZULTATI

U provedenom istraživanju, pretraživanjem nasumično odabranih uzoraka seruma konja s područja kontinentalne Hrvatske, od ukupno pretraženih 1180 seruma ELISA metodom je bilo 145 pozitivnih te 1023 negativnih seruma, a pretraživanjem 12 uzoraka seruma postignut je sumnjiv rezultat. Iz navedenoga proizlazi da je sveukupna seroprevalencija influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj određena ELISA metodom bila 12,3% (Tablica 1.).

Serološki pozitivne životinje potvrđene su u svim županijama kontinentalne Hrvatske s izuzetkom Brodsko-posavske županije. U 13 županija s ustanovljenim serološki pozitivnim životinjama seroprevalencija je varirala od 1,1% u Požeško-slavonskoj i Sisačko-moslavačkoj županiji do najviše od 32,6% u Virovitičko-podravskoj županiji (Tablica 1., Slika 3.).

Određujući značaj razlika u seroprevalenciji po pojedinim županijama u odnosu na cjelokupnu kontinentalnu Hrvatsku, ustanovljeno je da je seroprevalencija značajno niža u Brodsko-posavskoj ( $p = 0,0001$ ), Sisačko-moslavačkoj ( $p = 0,0001$ ) i Požeško-slavonskoj ( $p = 0,0089$ ) županiji. S druge strane, izrazito viša seroprevalencija u odnosu na cjelokupnu kontinentalnu Hrvatsku ustanovljena je na području Virovitičko-podravске županije ( $p = 0,0001$ ) te području Zagrebačke županije i Grada Zagreba ( $p = 0,0045$ ).



**Slika 3.** Seroprevalencija influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj

**Tablica 1.** Seroprevalencija influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj određena ELISA metodom

Županija	Broj pretraženih uzoraka	ELISA			Seroprevalencija (%)
		Pozitivno	Sumnjivo	Negativno	
<b>Bjelovarsko-bilogorska</b>	92	16	2	74	<b>17,4</b>
<b>Brodsko-posavska</b>	76	0	0	76	<b>0,0</b>
<b>Karlovačka</b>	93	11	1	81	<b>11,8</b>
<b>Koprivničko-križevačka</b>	92	7	1	84	<b>7,6</b>
<b>Krapinsko-zagorska</b>	92	14	3	75	<b>15,2</b>
<b>Međimurska</b>	92	6	0	86	<b>6,5</b>
<b>Osječko-baranjska</b>	92	8	0	84	<b>8,7</b>
<b>Požeško-slavonska</b>	92	1	3	88	<b>1,1</b>
<b>Sisačko-moslavačka</b>	91	1	0	90	<b>1,1</b>
<b>Virovitičko-podravska</b>	92	30	1	61	<b>32,6</b>
<b>Vukovarsko-srijemska</b>	92	16	0	76	<b>17,4</b>
<b>Varaždinska</b>	92	13	0	79	<b>14,1</b>
<b>Zagrebačka i Grad Zagreb</b>	92	22	1	69	<b>23,9</b>
<b>UKUPNO</b>	<b>1180</b>	<b>145</b>	<b>12</b>	<b>1023</b>	<b>12,3</b>

Pretraživanje metodom IHA 196 nasumično odabranih uzoraka seruma, ranije pretraženih ELISA metodom, načinjeno je u svrhu validacije korištenog dijagnostičkog ELISA kompleta. Od 127 uzoraka seruma pozitivnih pretraživanjem ELISA metodom, pozitivan nalaz metodom IHA potvrđen je za 77 seruma (60,6%), dok je negativno bilo 50 seruma (39,4%). Od 11 uzoraka seruma sa sumnjivim rezultatom pretraživanja ELISA metodom, IHA pozitivno je bilo pet seruma (45,5%), a negativno njih šest (54,5%). Pretraživanjem 58 uzoraka seruma koji su bili negativni prethodnim pretraživanjem ELISA metodom, 53 uzorka (91,4%) su potvrđena kao negativna dok je preostalih pet uzoraka (8,6%) bilo pozitivno pretraživanjem IHA (Tablica 2.).



**Tablica 2.** Usporedni rezultati pretraživanja seruma konja s ELISA testom i IHA

	ELISA	IHA	
		Pozitivni	Negativni
<b>Pozitivno</b>	127	77	50
<b>Sumnjivo</b>	11	5	6
<b>Negativno</b>	58	5	53
<b>UKUPNO</b>	<b>196</b>	<b>87</b>	<b>109</b>

Temeljem navedenih rezultata načinjena je validacija korištenog ELISA kompleta usporedbom rezultata postignutih ELISA metodom s rezultatima postignutim referentnom metodom za dijagnostiku influence konja, IHA.

Osjetljivost korištene ELISA metode, uz graničnu vrijednost interpretacije pozitivnih rezultata  $\leq 50\%$ , iznosila je 94,25% s rasponom od 87,10% do 98,11% uz stupanj pouzdanosti od 95%. Specifičnost, uz istu graničnu vrijednost interpretacije ELISA rezultata, iznosila je 48,62% s rasponom od 38,94% do 58,39% uz isti stupanj pouzdanosti od 95% (Tablica 3.). Pozitivna prediktivna vrijednost za postavljenu graničnu vrijednost  $\leq 50\%$  bila je 59,42% (50,74% - 67,69% uz granicu pouzdanosti od 95%), a negativna prediktivna vrijednost 91,38% (81,02% - 97,14 uz granicu pouzdanosti od 95%) (Tablica 3.). Kappa vrijednost između rezultata IHA i ELISA-e za graničnu vrijednost ELISA-e  $\leq 50\%$  je iznosila 0.405 uz raspon od 0.297 do 0.513 sa intervalom pouzdanosti od 95% što govori o umjerenj podudarnost rezultata.

Uz graničnu vrijednost interpretacije pozitivnih rezultata  $\leq 45\%$ , osjetljivost ELISA testa bila je niža i iznosila 88,51% s rasponom od 79,88% do 94,35% uz stupanj pouzdanosti od 95%. Specifičnost je nešto povećana na 54,13% uz raspon od 44,32% do 63,71% uz isti stupanj pouzdanosti od 95%. Pozitivna prediktivna vrijednost je također povećana i iznosila je 60,63% (51,57% - 69,18% uz granicu pouzdanosti od 95%), a negativna prediktivna vrijednost smanjena je na 85,51% (74,96% - 92,83% uz granicu pouzdanosti od 95%) (Tablica 3.). Kappa vrijednost između rezultata IHA i ELISA-e za graničnu vrijednost ELISA-e  $\leq 45\%$  je bila nešto viša te iznosila 0.407 uz raspon od 0.292 do 0.523 sa intervalom pouzdanosti od 95% što također predstavlja umjerenu podudarnost rezultata.

**Tablica 3.** Određivanje specifičnosti i osjetljivosti, prediktivnih vrijednosti i podudarnosti rezultata ELISA testa u odnosu na rezultate IHA ovisno o promjeni granične vrijednosti interpretacije pozitivnih rezultata

	<b>Granična vrijednost ELISA testa <math>\leq 50\%</math></b>	<b>Raspon vrijednosti uz indeks pozdanosti 95%</b>	<b>Granična vrijednost ELISA testa <math>\leq 45\%</math></b>	<b>Raspon vrijednosti uz indeks pozdanosti 95%</b>
<b>Osjetljivost</b>	94,25%	87,10% - 98,11%	88,51%	79,88% - 94,35%
<b>Specifičnost</b>	48,62%	38,94% - 58,39%	54,13%	44,32% - 63,71%
<b>Pozitivna prediktivna vrijednost</b>	59,42%	50,74% - 67,69%	60,63%	51,57% - 69,18%
<b>Negativna prediktivna vrijednost</b>	91,38%	81,02% - 97,14%	85,51%	74,96% - 92,83%
<b>Kappa vrijednost</b>	0,405	0,297 – 0,513	0,407	0,292 – 0,523

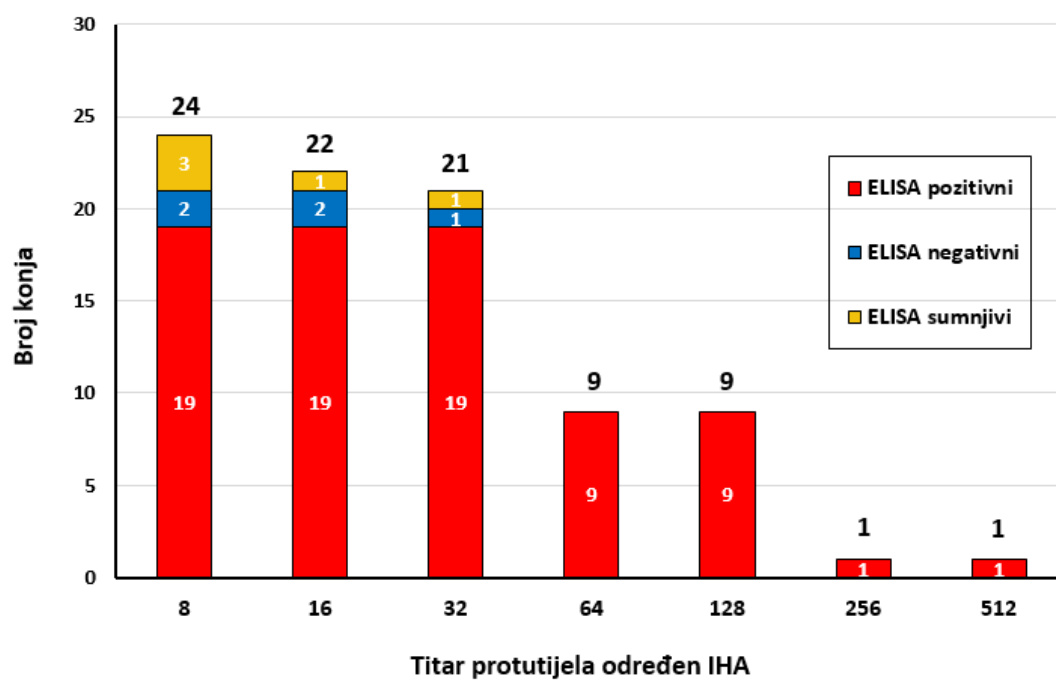
Uspoređujući rezultate pretraživanja istih seruma ELISA metodom i metodom IHA ustanovljeno je da je pet ELISA negativnih seruma bilo IHA pozitivno. U tri takva seruma ustanovljen je titar 1:8 te u po jednom titar 1:16 odnosno 1:32. Od 11 pretražvanih ELISA sumnjivih seruma pet je bilo pozitivnih IHA s titrovima u po dva seruma od 1:8 i 1:16 te titrom 1:32 u jednom pretraženom serumu. Od 127 ELISA pozitivnih seruma metodom IHA potvrđeno je kao pozitivno njih 77 s ustanovljenim titrovima u rasponu od 1:8 do 1:512 (Tablica 4.).

Analizom navedenih rezultata uočeno je da je titar specifičnih protutijela u ELISA negativnim ili sumnjivim, a IHA pozitivnim serumima bio  $\leq 1:32$  s najvećim brojem seruma s titrom 1:8 (50%), dok su rezultati pretraživanja s obje metode seruma s očitanim titrovima višim od 1:32 bili potpuno podudarni (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Rezultati određivanja titra specifičnih protutijela metodom IHA i rezultata ELISA metodom

Titar protutijela (IHA)	Rezultat pretraživanja ELISA metodom		
	Pozitivno	Sumnjivo	Negativno
< 8	50	6	53
8	19	2	3
16	19	2	1
32	19	1	1
64	9	0	0
128	9	0	0
256	1	0	0
512	1	0	0
<b>UKUPNO</b>	<b>127</b>	<b>11</b>	<b>58</b>

Od ukupno 196 seruma pretraženih metodom IHA pozitivnih je ukupno bilo 87. Visina titra u pozitivnim serumima varirala je od 1:8 do 1:512. U najvećem broju pretraživanih seruma pozitivnih metodom IHA ustanovljen je titar specifičnih protutijela od 1:8 (27,6%), zatim 1:16 (25,3%) te 1:32 (24,1%). U značajno manjem broju seruma ustanovljen je titar 1:64 (10,3%) i 1:128 (10,3%), dok je u samo po jednom serumu titar specifičnih protutijela bio 1:256 (1,1%), odnosno 1:512 (1,1%) (Tablica 4., Slika 4.).



**Slika 4.** Broj životinja s očitanom pojedinom vrijednošću titra protutijela metodom IHA

## 5. RASPRAVA

Istraživanjem seroprevalencije influence konja na području kontinentalne Hrvatske ELISA metodom je ustanovljena ukupna seroprevalencija od 12,3%. Uzevši u obzir svojstva korištene metode, da dokazuje specifična protutijela koja nastaju kao posljedica infekcije, a ne cijepljenja vektorskim rekombinantnim cjepivima dostupnim na području RH, ovo je izrazito visoka seroprevalencija. Ovako veliki broj inficiranih životinja indirektno potvrđuje da je veliki broj prijavljenih epizootija respiratornih simptoma u konja krajem ožujka i početkom travnja 2015. godine doista bio uzrokovan virusom influence. U prilog opsežnoj epizootiji na području cijele kontinentalne Hrvatske ide i činjenica da su pozitivne životinje potvrđene u svim županijama s izuzetkom Brodsko-posavske županije. Tezu o velikoj epizootiji na cijelom istraživanom području tijekom 2015. godine dodatno potvrđuju metodom IHA ustanovljene vrijednosti titrova u pozitivnih životinja s najvećom učestalošću od 1:8 do 1:32 (77,0% pozitivnih pretraženih seruma). Navedeno ukazuje na zaražavanje u vrlo kratkom roku velikog broja životinja u različitim županijama. Uz potvrdu opsežne epizootije 2015., kroz dokaz ujednačenosti titrova protutijela određenih pretraživanjem IHA od 1:8 do 1:32 u velikog broja životinja, značajno je istaknuti da su zabilježeni i pojedinačni titrovi od 1:256 i 1:512. Navedeni titrovi su prema ranijim istraživanjima ustanovljeni tijekom akutne infekcije virusom influence, dva tjedna nakon zaražavanja (BARBIĆ i sur., 2009). Ovakve razlike nedvojbeno potvrđuju različito vrijeme zaražavanja ovih životinja u odnosu na ranije navedene. Iz toga proizlazi da se influenza konja na području kontinentalne Hrvatske tijekom 2015. godine pojavila kao jedna velika epizootija te nekoliko epizootija različitog opsega uključujući i akutne infekcije životinja u trenutku uzorkovanja. U prilog stanju u populaciji koje pogoduje eksplozivnom širenju bolesti na velikom prostoru, ali i lakom unošenju uzročnika, ide i ustanovljeni nizak cjepni obuhvat. Naime, kako korištena ELISA metoda dokazuje specifična protutijela za NP virusa influence, koja se stvaraju tijekom infekcije, a ne kao posljedica cijepljenja cjepivima dostupnim na tržištu RH, dokaz cijepljenja i izostanka infekcije je nalaz pozitivnih seruma IHA istovremeno negativnih ELISA metodom (PERKINS i sur., 2011.; GALVIN i sur., 2013.). U našem istraživanju od 58 ELISA negativnih uzoraka samo pet (8,6%) ih je bilo IHA pozitivno što je indirektni dokaz cijepljenja. Ovo dodatno potvrđuju i anamnestički podaci o pasminama ovih konja kojima je ustanovljeno da su četiri od pet životinja toplokrvne pasmine, a upravo u ovoj populaciji se na području RH i provodi cijepljenje, iako na žalost u zanemarivom opsegu. Cjepni obuhvat od 8,6% zasigurno nije dovoljan za sprječavanje nastanka i širenja epizootija ovako kontagiozne

zarazne bolesti čega su izravne posljedice i veliki broj inficiranih životinja tijekom 2015. godine. Uspoređujući seroprevalenciju ustanovljenu u prikazanom istraživanju s recentnim rezultatima istraživanja drugih autora provedenim u državama sa slabijim stupnjem provođenja imunoprofilakse, možemo reći da je ustanovljena seroprevalencija od 12,3% značajno viša od ustanovljene u primjerice Iranu, određene korištenjem iste metode, koja je iznosila od 2,5% do 7,5% (BADIEI i sur., 2013.). S druge strane u nekim istraživanjima opisana je i značajno viša seroprevalencija određena istom metodom koja je primjerice u Izraelu iznosila 26,4% (AHARONSON-RAZ i sur., 2014.), odnosno u Kostarici čak 41,8% (JIMÉNEZ i sur., 2014.).

Sveukupno gledajući, s obzirom da se konjogojstvo i konjički sport u Hrvatskoj razvija intenzivno posljednjih godina, neophodno je da se i svijest vlasnika i struke o značaju zaštite konja od zaraznih bolesti podigne na znatno višu razinu kako ne bi ponovno svjedočili ovako opsežnim epizootijama sa značajnim gospodarskim gubicima.

Analizirajući podatke o seroprevalenciji po županijama, istraživanje je potvrdilo značajnu razliku u seroprevalenciji u pojedinim djelovima kontinentalne Hrvatske. Značajno viša seroprevalencija zabilježena je na području Virovitičko-podravske (32,6%) županije te na području Grada Zagreba i Zagrebačke županije (23,9%). Ovaj rezultat može se objasniti pasminskom strukturom i namjenom konja s navedenih područja. Naime, upravo na ovim područjima su zastupljenije životinje toplokrvnih pasmina koje se koriste za sport i koje su tijekom boravka na natjecanjima izloženije infekciji koju povratkom u matične uzgoje lako šire na druge životinje. U prilog navedenom ide i značajno manja seroprevalencija na području Sisačko-moslavačke županije (1,1%) gdje iako je područje s najvećim brojem konja u RH, dominiraju hladnokrvne pasmine koje se koriste za meso ili kao radne životinje te borave u relativno zatvorenim uzgojima uz minimalni kontakt s ostalim konjima. U skladu s navedenim je i niska prevalencija u Požeško-slavonskoj županiji (1,1%) gdje je mala populacija konja koja također živi u relativno zatvorenim uzgojima. Izostanak pozitivnih životinja u Brodsko-posavskoj županiji donekle se može objasniti prethodno navedenim razlozima uz naglasak da je to područje s većom zastupljenošću konja lipicanske pasmine koji sudjeluju na različitim manifestacijama, ali primarno lokalnim, tako da je smanjena mogućnost unošenja infekcije iz inozemstva.

Usporedbom s istraživanjima provedenim u sličnim epizootiološkim prilikama niske razine svijesti o značaju nadzora zaraznih bolesti konja i niskog cjepnog obuhvata, također su opisivane razlike seroprevalencije u različitim dijelovima iste države poput primjerice

Meksika gdje je 2010. godine ustanovljena seroprevalencija u saveznoj državi Guerreru od 22%, dok je u Nuevo Leonu bila čak 58% (BLITVICH i sur., 2010.).

Temelj svakog sustava nadzora zaraznih bolesti je pravilan odabir dijagnostičkih metoda vodeći pri tom računa da se lako izvode, relativno su jeftine i omogućavaju pretraživanje velikog broja uzoraka u što kraćem vremenskom razdoblju. Ovaj posljednji uvjet je dodatno naglašen za izrazito kontagiozne bolesti poput influence konja. Stoga se u dijagnostici učestalo primjenjuju brzi testovi za dokaz antigena ili imunoenzimni testovi za dokaz protutijela. Validacijom 22 tržišno dostupna različita brza testa za dokaz antigena ustanovljeno je da samo 3 svojim dijagnostičkim svojstvima opravdavaju korištenje u dijagnostici influence konja (YAMANAKA i sur., 2016.). Stoga se većina dijagnostike i dalje temelji na serologiji.

Na tržištu postoje različite komercijalne ELISA metode koje su u posljednje vrijeme najčešće izrađene na principu blokirajuće ili kompetitivne ELISA-e. Također sve su češće one kojima se dokazuju specifična protutijela za NP virusa influence zbog mogućnosti razlikovanja infektivnih i cjepnih protutijela ako se u imunoprofilaksi koriste sve zastupljenija vektorska rekombinantna cjepiva.

Iako proizvođači navode izrazito visoke vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti komercijalnih ELISA testova, u neovisnim istraživanjima ustanovljeni su različiti, često kontradiktorni podaci koji su posljedica specifičnih epizootioloških prilika na određenom području.

U našem istraživanju usporedbom s rezultatima referentne metode IHA, osjetljivost korištene ELISA metode varira od 88,51% do 94,25% ovisno o graničnoj vrijednosti za interpretaciju pozitivnih rezultata. Ovaj rezultat je relativno zadovoljavajući za rutinsku primjenu. U usporedbi s rezultatima drugih autora on je manji u odnosu na ustanovljenu osjetljivost od 99,2% u istraživanju provedenom u Australiji (SERGEANT i sur., 2009.) ili 99,0% ustanovljenoj istraživanjem 2010. godine (KITTELBERGER i sur., 2011.). Međutim, osjetljivost određena našim istraživanjem istovremeno je značajno viša od osjetljivosti ustanovljene istraživanjem provedenim u Irskoj kada je osjetljivost iste metode iznosila samo 69,0% (GALVIN i sur., 2013.). Navedeni kontradiktorni podaci naglašavaju potrebu validacije ELISA metode u epizootiološkim prilikama pojedine države za donošenje odluke o opravdanosti njenog korištenja u rutinskoj dijagnostici.

Nasuprot relativno zadovoljavajućoj osjetljivosti, specifičnost je iznosila samo 48,62% do 54,13%, ovisno o graničnoj vrijednosti interpretacije pozitivnih rezultata. Ovakva specifičnost

je značajno niža u odnosu na specifičnost određenu od strane drugih autora koja je varirala od 95,0% do 97,2% (SERGEANT i sur., 2009.; KITTELBERGER i sur., 2011.; SERGEANT i sur., 2011.; GALVIN i sur., 2013.). Iznenađujuće niža specifičnost u odnosu na istraživanja drugih autora može biti posljedica velikog broja životinja sa izrazito niskim titrom protutijela, manjim od 1:8 određenim IHA, koji je još uvijek detektibilan ELISA metodom. Međutim, ova izrazito niska specifičnost ustanovljena našim istraživanjem može biti i posljedica križnih reakcija koje su posljedica infekcija konja na području kontinentalne Hrvatske nekim drugim uzročnikom koji nije prisutan na područjima provođenja sličnih istraživanja što mora biti dodatno istraženo.

Sveukupno gledano, uz zadovoljavajuću osjetljivost, nedostatna specifičnost korištene ELISA metode ne opravdava njeno korištenje u serološkoj dijagnostici influence konja na području kontinentalne Hrvatske te ne može biti zamjena za referentnu metodu IHA. Podudarnost rezultata korištenih metoda rezultira Kappa vrijednošću od 0,405 do 0,407 što je izrazito manje od primjerice 0,736 ustanovljene validacijom iste ELISA metode u Izraelu (AHARONSON-RAZ i sur., 2014.) te ne opravdava korištenje testa u rutinskoj dijagnostici u epizootiološkim prilikama kontinentalne Hrvatske.

Zaključno, influenza konja je široko proširena bolest na području kontinentalne Hrvatske gdje se pojavljuje u obliku višekratnih epizootija različitog opsega. Najproširenije infekcije su u područjima s većom zastupljenošću toplokrvnih konja koji se koriste za sport, a nešto manji je rizik u područjima s dominantnim hladnokrvnim pasminama ili životinjama koje sudjeluju na priredbama lokalnog značaja. Izrazito nizak obuhvat cijepljenja uz intenziviranje konjičkog sporta predstavlja veliki rizik za pojavljivanje epizootija bolesti u budućnosti pa je neophodno trenutno uvođenje sustava nadzora i sprječavanja širenja ove gospodarski izrazito značajne bolesti konja. U uspostavljanju sustava nadzora u epizootiološkim prilikama kontinentalne Hrvatske nije primjereno korištenje validirane ELISA metode nego je serološku dijagnostiku potrebno provoditi referentnom metodom IHA. Potrebno je i djelovanje u svrhu podizanja svijesti o prisutnosti i značaju ove bolesti kako među vlasnicima tako i u stručnoj javnosti, kako bi se povećao obuhvat cijepljenja i kontrole te spriječilo nesmetano širenje bolesti u predstojećem razdoblju. Sve navedeno potrebno je radi osiguravanja uvjeta za nastavak razvoja konjogojstva u RH, ali dijelom i iz javnozdravstvenih razloga s obzirom na u ovom trenutku mali, ali ipak postojeći zoonotski potencijal bolesti.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Influenca konja je široko proširena bolest u kontinentalnoj Hrvatskoj sa seroprevalencijom, određenom ELISA testom, od 12,3%.
2. Između županija postoji značajna razlika u proširenosti tako da su područja s visokom proširenošću Grad Zagreb i Zagrebačka županija te Virovitičko-podravska županija, a županije sa značajno nižom seroprevalencijom Sisačko-moslavačka, Požeško-slavonska te Brodsko-posavska županija.
3. Prema visini titrova, influenza konja se u kontinentalnoj Hrvatskoj pojavljuje epizootijski, te je tijekom 2015. godine bile jedna opsežna, ali i više manjih epizootija bolesti u različitom vremenskom razdoblju.
4. Korišteni dijagnostički ELISA test, usporedbom postignutih rezultata s referentnom metodom IHA, pokazao je zadovoljavajuću osjetljivost (88,51% - 94,25%), ali nedostatnu specifičnost (48,62% - 54,13%) te nije pogodan za rutinsku primjenu u dijagnostici influence konja u epizootiološkim prilikama RH.
5. Rezultati istraživanja, analizirajući svojstva korištenog ELISA testa i vrstu dostupnog cjepiva, ukazuju da je obuhvat cijepljenja konja protiv influence na području RH manji od 9%.
6. Visoka seroprevalencija, epizootijsko pojavljivanje bolesti i nizak obuhvat cijepljenja dokazuju izostanak nadzora influence konja te potrebu za njegovim hitnim uvođenjem u svrhu unaprjeđenja konjogojstva pri čemu se IHA nameće kao metoda izbora sukladno epizootiološkim prilikama na području RH.

## 7. LITERATURA

- AHARONSON-RAZ, K., I. DAVIDSON, Y. PORAT, A. ALTORY, E. KLEMENT, A. STEINMAN (2014): Seroprevalence and Rate of Infection of Equine Influenza Virus (H3N8 and H7N7) and Equine Herpesvirus (1 and 4) in the Horse Population in Israel. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 828–832.
- ANONIMNO (2015a): Equine influenza. Chapter 2.5.7. U: OIE Terrestrial Manual 2015, 1-15. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.07\\_EQ\\_INF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_INF.pdf), pristup mrežnoj stranici 15. ožujka 2015.
- ANONIMNO (2015b): Potvrđena pojava Influence konja na širem području zemlje. <http://www.mps.hr/default.aspx?id=15290>, pristup mrežnoj stranici 15. ožujka 2016.
- BADIEI, K., M. POURJAFAR, A. S. SAMIMI, M. ANSARI-LARI, A. MOHAMMADI, M. GHANE (2013): Study on risk factors and serologic prevalence of antibodies against equine influenza virus in the south of Iran. *Comp. Clin. Pathol.* 23, 929-932.
- BARBIĆ, LJ., J. MADIĆ, N. TURK, J. DALY (2009): Vaccine failure caused an outbreak of equine influenza in Croatia. *Vet. Microbiol.* 133, 164–171.
- BLITVICH, B. J., L. A. IBARRA-JUAREZ, A. J. CORTES-GUZMAN, J. J. ROOT, A. B. FRANKLIN, H. J. SULLIVAN, I. FERNANDEZ-SALAS (2010): Seroprevalence of equine influenza virus in north-east and southern Mexico. *Vet. Rec.* 166, 565-566.
- COGGINS L. (1979): Viral respiratory disease. *Vet. Clin. North. Am. Large Anim. Pract.* 1, 59–72.
- COWLED, B., M.P. WARD, S. HAMILTON, G. GARNER (2009): The equine influenza epidemic in Australia: spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic. *Prev. Vet. Med.* 92, 60–70.
- CVETNIĆ, S., M. KRALJ (1970): The First Isolation of Myxovirus Influenzae A2-equi in Yugoslavia. *Zbl. Vet. Med. B* 17, 256-261.
- CVETNIĆ, S., M. KRALJ, Ž. ŽUPANČIĆ (1967): Epizootiological Aspects of the Presence of Haemagglutinating (HI) Antibodies against Viruses Influenza A1-equine (Prague) 56 and Parainfluenza 3 (PI 3) in Horse Sera in Croatia. *Zbl. Vet. Med. B* 14, 714-722.

CVETNIĆ, S., V. MAYER (1974): Virus influenzae A<sub>1</sub>-equi; njegova izolacija i neke osobitosti epizootije influence konja 1973. god. Vet. arhiv 44, 85-90.

ČAČ, Ž., S. CVETNIĆ (1976): Influenca konja: Rasprostranjenost heminhibirajućih antitijela u konjskim serumima 1974. i 1975. godine. Vet. arhiv 46, 59-64.

DONELAN, N.R., C.F. BASLER, A. GARCIA-SASTRE (2003): A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. J. Virol. 77, 13257–13266.

FISHER, R. A. (1922). On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. J. R. Stat. Soc. 85, 87–94.

GALVIN, P., S. GILDEA, S. ARKINS, C. WALSH, A. CULLINANE (2013): The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). Influenza Other Respir. Viruses 7, 73–80.

HERRMANN, B., C. LARSSON, B.W. ZWEYGBERG (2001): Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription–PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). J. Clin. Microbiol. 39, 134–138.

JIMÉNEZ, D., J.J. ROMERO-ZUÑIGA, G. DOLZ (2014): Serosurveillance of infectious agents in equines of the Central Valley of Costa Rica. Open Vet. J. 4, 107-112.

JUKIĆ, B. (1972): Influenca konja: serološki nalaz u postepizootskom razdoblju. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

KIRKLAND P.D., G. DELBRIDGE (2011): Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies. Aust. Vet. J. 89, 45–46.

KITTELBERGER, R., A.M. MCFADDEN, M.J. HANNAH, J. JENNER, R. BUENO, J. WAIT, P.D. KIRKLAND, G. DELBRIDGE, H.G. HEINE, P.W. SELLECK, T.W. PEARCE, C.J. PIGOTT, J.S. O'KEEFE (2011): Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses. Vet. Microbiol. 148, 377–83.

KRUG, R.M., W. YUAN, D.L. NOAH, A.G. LATHAM (2003): Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* 309, 181–189.

LAMB, R.A., R.M. KRUG (2001): Orthomyxoviruses: the viruses and their replication, U: *Fields Virology*. (Knipe D.M., Howley P.M., ured.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1487-1532.

MADIĆ, J. (1984): Influenza konja: Istraživanje protutijela metodom inhibicije hemaglutinacije i metodom jednosmjerne radijalne hemolize. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

MADIĆ, J., S. MARTINOVIĆ, T. NAGLIĆ, D. HAJSIG, S. CVETNIĆ (1996): Serological evidence for the presence of A/equine-1 influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. *Vet. Rec.* 138, 68.

MATROSOVICH, M.N., T.Y. MATROSOVICH, T. GRAY, N.A. ROBERTS, H.D. KLENK (2004): Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.* 78, 12665–12667.

PERKINS, N.R., W.R. WEBSTER, T. WRIGHT, I. DENNEY, I. LINKS (2011): Vaccination program in the response to the 2007 equine influenza outbreak in Australia. *Aust. Vet. J.* 89, 126–134.

READ, A.J., K.E. ARZEY, D.S. FINLAISON, X. GU, R.J. DAVIS, L. RITCHIE, P.D. KIRKLAND (2012): A prospective longitudinal study of naturally infected horses to evaluate the performance characteristics of rapid diagnostic tests for equine influenza virus. *Vet. Microbiol.* 156, 246–255.

SERGEANT, E.S.G., P.D. KIRKLAND, B.D. COWLED (2009): Field evaluation of an equine influenza ELISA used in New South Wales during the 2007 Australian outbreak response. *Prev. Vet. Med.* 92, 382–385.

SERGEANT, E.S.G., B.D. COWLED, P. BINGHAM (2011): Diagnostic specificity of an equine influenza blocking ELISA estimated from New South Wales field data from the Australian epidemic in 2007. *Aust. Vet. J.* 89, 43–45.

SETO, J.T., R. ROTT (1966): Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication. *Virology* 30, 731–737.

SKEHEL, J.J., D.C. WILEY (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569.

VAN MAANEN, C., A. CULLINANE (2002): Equine influenza virus infections: an update. *Vet. Q.* 24, 79–94.

WEBSTER, R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, T.M. CHAMBERS, Y. KAWAOKA (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152–179.

WILSON, W.D. (1993): Equine influenza. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 257–282.

YAMANAKA, T., M. NEMOTO, H. BANNAI, K.TSUJIMURA, T. KONDO, T. MATSUMURA, S.GILDEA, A.CULLINANE (2016.): Evaluation of twenty-two rapid antigen detection tests in the diagnosis of Equine Influenza caused by viruses of H3N8 subtype. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 127-133.

## 8. SAŽETAK

Keti Kovačević

### **Određivanje seroprevalencije i validacija seroloških metoda dijagnostike influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj**

Provedenim istraživanjem dokazana je visoka seroprevalencija influence konja na području kontinentalne Hrvatske od 12,3%. Seroprevalencija je značajno varirala po županijama kontinentalne Hrvatske s najvišim vrijednostima na područjima s većom zastupljenošću toplokrvnih životinja koje se koriste u sportske svrhe. Najniža seroprevalencija zabilježena je u županijama s dominantnim uzgojem hladnokrvnih pasmina u ekstenzivnim uvjetima i županijama s ograničenim kretanjem životinja unutar manjih epizootioloških jedinica. Kroz određivanje vrijednosti titrova specifičnih protutijela metodom inhibicije hemaglutinacije ustanovljeno je različito vrijeme zaražavanja pojedinih životinja te indirektno dokazano da se influenza konja tijekom 2015. godine na području kontinentalne Hrvatske pojavljivala kao jedna veća epizootija te više epizootija manjeg opsega. Ustanovljeni zanemariv cjepni obuhvat, manji od 9%, uz rastuću populaciju konja i sve veći broj sportskih životinja naglašava mogućnost širenja bolesti i uzrokovanje značajnih gospodarskih šteta u budućnosti. Sukladno navedenim rezultatima, neophodno je hitno uvesti zakonski propisan sustav nadzora i suzbijanja influence konja u Republici Hrvatskoj na državnoj razini. Validacijom u svijetu učestalo korištenog ELISA testa ustanovljeno je da u epizootiološkim prilikama konjogojstva RH on ne zadovoljava dijagnostičke potrebe zbog izrazito niske specifičnosti (48,62% - 54,13%). Stoga bi uvođenje programa trebalo provesti kroz nadzor serološkim pretraživanjem životinja metodom inhibicije hemaglutinacije. Uz uspostavu nadzora, neophodno je intenzivirati cijepljenje konja te raditi na edukaciji vlasnika, ali i struke, radi podizanja svijesti o visokom riziku od ove značajne bolesti konja na području RH. Provođenjem navedenoga izbjegle bi se epizootije bolesti u budućnosti, umanjile gospodarske štete te sveukupno unaprijedilo daljnji razvoja konjogojstva na području RH.

**Ključne riječi:** influenza konja, seroprevalencija, imunoenzimni test, inhibicija hemaglutinacije

## 9. SUMMARY

Keti Kovačević

### **Equine influenza seroprevalence and validation of serological diagnostic methods in continental part of Croatia**

This study has shown equine influenza seroprevalence of 12,3% in continental part of Croatia. There was considerable variation of seroprevalence on county level. The highest recorded values were in the counties with a higher number of hot-blooded sport animals. On the other hand the lowest seroprevalences were in the counties with a free ranged cold-blooded horse population predominantly kept for meat production and rarely transported. Haemagglutination inhibition titre values confirmed different time of an infection. Clearly, there was one major outbreak in the continental part of Croatia in 2015, but also numerous smaller ones. The portion of vaccinated animals was less than 9%. Taking in consideration the low percentage of vaccinated horses along with increasing number of sport horses and horses in total indicate the high possibility of future outbreaks and considerable losses. In conclusion this study has shown urge of influenza surveillance and control system introduction at the state level in Croatia. Validation of one of the commonly used commercial ELISA kits has demonstrated that it is not the most suitable diagnostic method for screening in specific epizootiological conditions in Croatia due to low specificity (48,62% - 54,13%). Based on these results IHA testing is more suitable. The introduction of surveillance and intensification of vaccination should be done along with raising awareness about this important horse disease in Croatia. Altogether is the only possible way to prevent future outbreaks and high losses which could guarantee development of horse industry in Croatia.

**Key words:** equine influenza, seroprevalence, enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination inhibition assay

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.03.1992. godine u Zenici u Bosni i Hercegovini. Školovanje sam započela u Osnovnoj školi Nikole Tesle u Gračacu te osmi razred završila 2006. godine u Osnovnoj školi Domovinske zahvalnosti u Kninu. Potom me zanimanje za područje biomedicine usmjerilo na upis u Medicinsku i kemijsku školu Šibenik, smjer farmaceutski tehničar, gdje sam odličnim uspjehom i osvojenim trećim mjestom na Državnom natjecanju „Schola medica 2010“ dobila nagradu i priznanje za ostvareni uspjeh od župana u ime Šibensko-kninske županije.

Godine 2010. upisala sam Veterinarski fakultet u Zagrebu kojeg sam uspješno završila kao redoviti student s prosjekom ocjena položenih ispita 4.23. Tijekom studiranja praktično znanje nadopunila sam volontiranjem u Veterinarskoj ambulanti Vodice te Veterinarskoj ambulanti Buba u Zagrebu, a znanje njemačkog jezika okušala sam i u veterinarskoj praksi Tierarztpraxis-Haidhasen u Münchenu. Sudjelovala sam i u provođenju znanstvenog istraživanja na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na temu određivanje seroprevalencije i validacija dijagnostičkih metoda dijagnostike influence konja u kontinentalnoj Hrvatskoj radi izrade studentskog znanstvenog rada. Dio rezultati istraživanja predstavljen je na međunarodnom znanstvenom kongresu 22<sup>nd</sup> SIVE international congress, održanom u Milanu, Italija, a cijeloviti rezultati prikazani su u znanstvenom radu prihvaćenom za objavljivanje u časopisu Veterinarski arhiv.