

# Određivanje etiologije i značajki citološkog nalaza u konja s kroničnim upalama donjih dišnih prohoda

---

Miljak, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:806689>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

**Veterinarski fakultet**

**Katarina Miljak**

**ODREĐIVANJE ETIOLOGIJE I ZNAČAJKI CITOLOŠKOG  
NALAZA U KONJA S KRONIČNIM UPALAMA DONJIH  
DIŠNIH PROHODA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj rad je izrađen u suradnji Zavoda za patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Predstojnik:** doc. dr. sc. Marko Hohšteter

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ana Beck

**Mentor:** doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

**Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. izv. prof. dr. sc. Ana Beck
3. doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. prof. dr. sc. Željko Grabarević (zamjena)

## **Zahvala**

Posebno se zahvaljujem svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Ani Beck i doc. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću, koji su uvijek bili na raspolaganju za sva moja pitanja i koji su mi svojim stručnim i prijateljskim savjetima pomogli u izradi ovog diplomskog rada.

Od srca se zahvaljujem mr. sc. Goranu Csiku, dr. med. vet. i dr. sc. Jeleni Gotić bez čijeg entuzijazma ovo istraživanje ne bi bilo moguće, te dr. sc. Maji Maurić na individualnim satima statistike.

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji i prijateljima, koji su bili uz mene u najtežim trenucima i koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh – *hvala vam, jer bez vas ne bi danas bila tu gdje jesam.*

Hvala što ste mi učinili proteklih šest godina studija nezaboravnim.

## POPIS KRATICA

ACVIM – *American College of Veterinary Internal Medicine*

B.O. – bez osobitosti

BAL – bronhoalveolarni ispirak (engl. *bronchoalveolar lavage* )

BALF – bronhoalveolarna tekućina (engl. *bronchoalveolar lavage fluid*)

BPIV – goveđi parainfluenca virus (engl. *bovine parainfluenza virus*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EAV – virus arteritisa konja (engl. *equine arteritis virus*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EHV – konjski herpesvirus (engl. *equine herpesvirus*)

EIV – konjski virus influence (engl. *equine influenza virus*)

ERAV – konjski rinitis A virus (engl. *equine rhinitis A virus*)

ERBV – konjski rinitis B virus (engl. *equine rhinitis B virus*)

IAD – upalna bolest dišnih prohoda (engl. *inflammatory airway disease*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

RAO – rekurentna opstrukcija dišnih prohoda (engl. *recurrent airway obstruction*)

RH – Republika Hrvatska

RNK – ribonukleinska kiselina

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom s obrnutom transkripcijom (engl. *reverse transcription PCR*)

TA – ispirak dušnika (engl. *tracheal aspirate*)

## **POPIS TABLICA I SLIKA**

### Tablice:

Tablica 1. Prikaz sličnosti i razlika između kliničkog nalaza i dijagnostičkih testova za upalnu bolest dišnih prohoda (IAD) i rekurentnu opstrukciju dišnih prohoda RAO. Preuzeto i prilagođeno iz COUËTIL i sur., 2016.

Tablica 2. Rezultati kliničke pretrage konja – skupina „IAD“.

Tablica 3. Rezultati kliničke pretrage – skupina „OSTALI SINDROMI“ (s podjelom na podskupinu „RAO“ i „OIS“).

Tablica 4. Prikaz kvalitete citoloških razmazaka konja iz skupine IAD.

Tablica 5. Prikaz kvalitete citoloških razmazaka konja iz skupine OSTALI SINDROMI.

Tablica 6. Prikaz udjela staničnih tipova prema podjeli u kliničke sindrome.

### Slike:

Slika 1. Prikaz najznačajnijih citoloških nalaza

Slika 2. Prikaz citološkog izgleda sluzi

Slika 3. Prikaz najvažnijih rezultata dobivenih PCR metodom

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>2</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>5</b>
3.1. Uzorak .....	5
3.2. Nalaz kliničkog pregleda .....	5
3.3. Citološki nalaz .....	6
3.3.1. Brojenje stanica .....	6
3.3.2. Ocjena morfologije stanica .....	6
3.3.3. Određivanje staničnosti .....	7
3.3.4. Ocjena količine i morfologije sluzi .....	7
3.3.5. Mikroskopska ocjena prisustva bakterija .....	7
3.4. Virusološka pretraga .....	7
3.5. Statistička obrada rezultata .....	8
3.5.1. Grupiranje podataka za statističku obradu .....	8
3.5.2. Statistička deskripcija i analiza .....	9
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>10</b>
4.1. Rezultati kliničkog pregleda .....	10
4.2. Rezultati citološke pretrage .....	14
4.3. Rezultati virusološke pretrage .....	19
4.4. Rezultati statističke obrade .....	19
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>26</b>
<b>8. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>27</b>
<b>9. SAŽETAK</b> .....	<b>32</b>
<b>10. SUMMARY</b> .....	<b>33</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>34</b>

## 1. UVOD

Bolesti dišnog sustava imaju velik značaj u konjskoj industriji jer predstavljaju drugi najznačajniji uzrok smanjene radne sposobnosti trkaćih konja koja dovodi do velikih ekonomskih gubitaka (JEFFCOTT i sur., 1982.; ROSSDALE i sur., 1985.). Poseban značaj imaju kronične bolesti dišnog sustava konja koje se prema etiologiji dijele na infektivna i neinfektivna oboljenja (AINSWORTH i CHEETHAM, 2010.). U skupini kroničnih upala donjih dišnih prohoda konja nezarazne prirode, najznačajnije mjesto zauzimaju dva sindroma; rekurentna opstrukcija dišnih prohoda i upalna bolest dišnih prohoda, čije razlikovanje predstavlja veliki klinički izazov (MAIR, 1987.). Oba sindroma su u veterinarskoj medicini širom svijeta najčešće poznata pod svojim engleskim nazivima i to rekurentna opstrukcija dišnih prohoda kao „recurrent airway obstruction“ (RAO) te upalna bolest dišnih prohoda kao „inflammatory airway disease“ (IAD). Razlikovanje navedenih sindroma od ostalih oboljenja dišnog sustava, kao i njihovo međusobno razlikovanje, zahtjeva korištenje specijaliziranih dijagnostičkih testova poput endoskopske pretrage dušnika i bronha te citološke i mikrobiološke pretrage ispirka dušnika i/ili bronhoalveolarnog ispirka. Citološka pretraga ispirka dušnika i bronhoalveolarnog ispirka kao dijagnostička metoda po prvi puta je primijenjena u konja 1983. godine (VIEL, 1983.) te se od tada rutinski primjenjuje u svim svjetskim veterinarskim klinikama specijaliziranim za liječenje konja. U Republici Hrvatskoj dijagnostički protokoli za obradu kroničnih bolesti pluća u konja tek u posljednjih desetak godina uključuju citološku i mikrobiološku pretragu zahvaljujući uvođenju endoskopske pretrage.

S obzirom da trenutačno postoje razna ograničenja u objektivnoj dijagnostici kroničnih dišnih oboljenja konja u Republici Hrvatskoj, cilj ovog rada je prikazati dijagnostički značaj citološke i virusološke pretrage ispirka dušnika u konja s kroničnim oboljenjem dišnog sustava uz određivanje moguće poveznice između parametara kliničkog pregleda i endoskopske pretrage te citološke i virusološke pretrage ispirka dušnika koji bi olakšali postavljanje konačne dijagnoze. Provedeno retrospektivno kliničko istraživanje je prošireno prospektivnom standardiziranom mikroskopskom analizom staničnog sastava razmazaka ispiraka te molekularnim dokazom virusnih uzročnika iz dostupnih arhiviranih uzoraka, sa svrhom određivanja značaja i pojavnosti kroničnih oboljenja dišnog sustava konja, uspostave cjelovitog dijagnostičkog pristupa kroničnim upalama donjih dišnih puteva konja te određivanja uloge virusnih infekcija u etiologiji upala donjih dišnih puteva konja u Republici Hrvatskoj.



## 2. PREGLED LITERATURE

Rekurentna opstrukcija dišnih prohoda se očituje kao nezarazna upala povezana s učestalim epizodama kašlja, otežanim i ubrzanim disanjem u mirovanju te izrazito smanjenom radnom sposobnošću u populaciji konja starijih od sedam godina (COUËTIL i WARD, 2003.; ROBINSON i sur., 2003.) i na hrvatskom govornom području najčešće se naziva sipnjom konja. Upalna bolest dišnih prohoda, za razliku od sipnje, pogađa konje svih dobnih skupina, odlikuje se diskretnijim kliničkim znakovima uz smanjenu radnu sposobnost i povremenim epizodama kašlja dok se broj udisaja u mirovanju zadržava unutar fizioloških granica (CHRISTLEY i sur., 2001.). Za upalnu bolest dišnih prohoda ne postoji točan naziv u hrvatskom jeziku te se ovo stanje vrlo često miješa sa sipnjom odnosno rekurentnom opstrukcijom dišnih prohoda.

Brojna istraživanja navode različite čimbenike koji utječu na razvoj rekurentne opstrukcije dišnih prohoda (AINSWORTH i CHEETHAM, 2010.). Smatra se da nasljedna predispozicija u kombinaciji s izloženosti konja specifičnim alergenima i različitim upalnim čimbenicima rezultira ponavljajućim epizodama upale donjih dišnih prohoda (PIRIE i sur., 2002.). Točna patogeneza upalne bolesti dišnih prohoda također nije u potpunosti razjašnjena te se smatra da ulogu u njenom nastanku imaju različiti čimbenici (AINSWORTH i CHEETHAM, 2010.). Ipak, visoka koncentracija prašine u štalskom zraku prema mnogim autorima igra centralnu ulogu u razvoju ove bolesti (WOODS i sur., 1993.; ROSENTHAL i sur., 2006.). Navedeno potvrđuju brojna istraživanja kojima je ustanovljen povećan rizik za razvoj upalne bolesti dišnih puteva u konja koji većinu vremena borave u štali (MILLERICK-MAY i sur., 2011.; IVESTER i sur., 2014.). Uloga bakterijskih infekcija u razvoju navedenih bolesti još uvijek nije u potpunosti jasna. Razlog tome su razne znanstvene dvojbe oko činjenica je li pojačana sekrecija sluzi u konja koji su razvili simptome stvorila preduvjet za bakterijsku kolonizaciju donjih dišnih prohoda, ili je bakterijska kolonizacija donjih dišnih prohoda uzrok slabljenja mukocilijarnog aparata s posljedičnim nakupljanjem prekomjerne količine sluzi. U sadržaju sluzi donjih dišnih prohoda u obje bolesti zabilježeni su slučajevi u kojima su izolirane bakterije poput *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus sp.* i *Pasteurella sp.* Isti uzočni izolirani su i u sadržaju sluzi dušnika klinički zdravih trkaćih konja (WOOD i sur., 2005.b; CARDWELL i sur., 2014.).

Uloga virusnih infekcija u nastanku navedenih sindroma također nije jasna i danas je predmet istraživanja brojnih znanstvenika. U ljudi, koji oboljevaju od sličnog upalnog stanja

donjih dišnih prohoda, poznatog pod nazivom astma, dokazana je jasna povezanost virusnih infekcija s nastupom i egzacerbacijom simptoma, osobito s infekcijom ljudskim rinovirusom (KHETSURIANI i sur., 2007.; FUJITSUKA i sur., 2011.). Iako nema dokaza da je infekcija konjskim virusom iz iste skupine povezana s nastankom rekurentne opstrukcije dišnih prohoda ili upalne bolesti dišnih prohoda, dokazano je da infekcije izazvane pojedinim pripadnicima porodice Herpesviridae u konja mogu dovesti do upalnih promjena u donjim dišnim prohodima koje traju tjednima pa čak i doživotno (FORTIER i sur., 2013.). Dokaz bakterija i virusa u sluzi donjih dišnih prohoda može se povezati s multikauzalnom etiologijom navedenih sindroma, ali izolacija specifičnog uzročnika ima važnu ulogu u potvrdi infekcije dišnog sustava koja je klinički praćena općim infekcioznim sindromom, odnosno povećanom tjelesnom temperaturom i povećanim brojem udisaja u mirovanju (COUËTIL i sur., 2007.).

U oba se sindroma, endoskopskom pretragom, uočava prekomjerno nakupljanje sluzi u dišnim prohodima te ih je na temelju tog nalaza nemoguće razlikovati (GERBER i sur., 2004.). Razlike između rekurentne opstrukcije dišnih prohoda i upalne bolesti dišnih prohoda najjednostavnije je uočiti kroz usporedni tablični prikaz (Tablica 1) gdje su navedene razlike u nacionalu, anamnestičkim podacima, kliničkoj slici i rezultatima specijalističkih pretraga poput endoskopskog i citološkog nalaza.

**Tablica 1. Prikaz sličnosti i razlika između kliničkog nalaza i dijagnostičkih testova za upalnu bolest dišnih prohoda (IAD) i rekurentnu opstrukciju dišnih prohoda RAO. Preuzeto i prilagođeno iz COUËTIL i sur., 2016.**

Klinički nalaz	IAD	RAO
<b>Dob</b>	Sve dobne skupine	>7 godina
<b>Klinički znakovi</b>	Povremene epizode kašlja Smanjena atletska sposobnost Učestalost udisaja u mirovanju u fiziološkim granicama	Učestale epizode kašlja Ograničavajuća tjelesna aktivnost Povišen broj udisaja u mirovanju
<b>Anamneza</b>	Prašina u stajskom zraku	Alergeni u staji ili na pašnjaku
<b>Dijagnostička potvrda</b>		
<b>Endoskopija donjih dišnih prohoda</b>	Povećana količina sluzi	Povećana količina sluzi
<b>Citološki nalaz BAL</b>	6-19% udio neutrofila uz prisutstvo eozinofila i mastocita	>20% neutrofila uz smanjen udio makrofaga i limfocita
<b>Funkcionalni test pluća</b>	Nema opstrukcije protoka zraka	Opstrukcija u protoku zraka

Valja istaknuti da je tjelesna temperatura u konja s rekurentnom opstrukcijom dišnih prohoda, kao i u konja s upalnom bolesti dišnih prohoda unutar fizioloških granica. Pretpostavka za kliničko razlikovanje navedenih sindroma može se izvući i iz činjenice da konji s rekurentnom opstrukcijom dišnih prohoda u mirovanju imaju veći broj udisaja u minuti, za razliku od konja s upalnom bolesti dišnih prohoda (COUËTIL i sur., 2016.).

U dijagnostiku navedenih sindroma su obavezno uvršteni protokoli za isključivanje svih ostalih uzroka kroničnog oboljenja dišnog sustava u konja poput verminozne i gljivične pneumonije te primarnih i metastatskih neoplazmi pluća uz bakterijske i virusne pneumonije i bronhopneumonije (AINSWORTH i CHEETHAM, 2010.). Složenost dijagnostičkog protokola dodatno opterećuju i kronične upale gornjih dišnih prohoda u kojih je također zabilježen dugotrajni kašalj i smanjena radna sposobnost konja, no auskultatornim nalazom pooštrenog dišnog šuma nad dušnikom uz izostanak nalaza sluzi i znakova upale endoskopskom pretragom donjih dišnih prohoda, moguće je klinički isključiti ovu skupinu bolesti (COUËTIL i sur., 2016.). Endoskopski pregled dušnika je neizostavan korak u dijagnostici kroničnih nezaraznih upala donjih dišnih prohoda jer daje uvid u prisustvo i količinu sluzi koja se nalazi u donjim dišnim prohodima konja. Iz uzorka sluzi provode se daljnje pretrage na temelju kojih se može potvrditi klinička sumnja na kronično oboljenje u donjem dijelu dišnog sustava (GERBER i sur., 2004.). Određivanje količine i kvalitete sluzi u donjim dišnim prohodima ovisi o dubini uzorkovanja sluzi unutar donjeg dijela dišnog sustava. Ovisno o standardizaciji dijagnostičkog protokola pojedine klinike te njenoj opremljenosti, određivanje udjela upalnih stanica u bronhoalveolarnom ispirku (BAL, engl. *bronchoalveolar lavage*) ili u ispirku dušnika (TA, engl. *tracheal aspirate*) predstavlja dijagnostički standard. Brojnost i sastav stanica u citološkim uzorcima variraju ovisno o lokalizaciji upalnih žarišta u plućima, te o samoj tehnici prikupljanja sluzi. U sadržaju ispirka dušnika nalaze se stanice gornjih dišnih prohoda u dominantnim omjerima u odnosu na stanice bronhiola i alveolarnog područja, ali daju uvid u veću respiratornu površinu. Dok bronhoalveolarni ispirak daje točan uvid u sastav donjih dišnih putova, ali malog respiratornog segmenta u odnosu na ostalu površinu dišnih prohoda. Iz tog razloga sve više autora smatra da bi se za objektivnu dijagnostiku bolesti donjih dišnih prohoda trebalo analizirati oboje i ispirak dušnika i bronhoalveolarni ispirak (MALKIDIES i sur., 2003.). Multidisciplinarni pristup u dijagnostici kroničnih upalnih bolesti donjih dišnih prohoda konja jedini je ispravan pristup kojim se postavljaju temelji za pravilno etiološko liječenje životinje.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzorak**

Za potrebe istraživanja korišteno je 32 ispirka dušnika koji su dostavljeni na Zavod za veterinarsku patologiju i Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom razdoblja od ožujka 2014. do travnja 2017. godine. Uzorci su dostavljani u brizgalicama ili epruvetama s antikoagulansom etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), a potjecali su od konja s područja Republike Hrvatske koji su pokazivali kliničke znakove kronične bolesti donjeg dišnog sustava. Ispirak dušnika svakog konja pratili su podaci o spolu, dobi i pasmini, vrijednostima trijasa, prisutnosti kašlja i iscjetka iz nosa, kvaliteti disanja, auskultatornom nalazu nad plućima, trajanju kliničkih znakova, izgledu sluznice dušnika i količini sluzi u dušniku prilikom endoskopskog pregleda te podacima o eventualnom ranije provedenom liječenju. Ispirak je uvršten u istraživanje ukoliko su popratni podaci sadržavali minimalno 12 od mogućih 14 kategorija anamnestičkih i kliničkih podataka (Tablica 2 i 3).

#### **3.2. Nalaz kliničkog pregleda**

Prisutnost kašlja i iscjetka iz nosa tijekom dužeg razdoblja uz prisutnost otežanog disanja u mirovanju te njihovo pogoršanje prilikom napora činili su skupinu anamnestičkih podataka od dijagnostičkog značaja. Rezultati auskultatornog nalaza nad plućima razvrstani su prema intenzitetu u tri grupe; bez osobitosti (b.o.) = 0, manja područja pooštrenog dišnog šuma = 1 i veća područja pooštrenog dišnog šuma s nalazom hropaca, kreptacija ili emfizema = 2. Rezultati endoskopske pretrage sadržavali su opis sluznice dušnika te prisutnost i količinu sadržaja u lumenu. Izgled sluznice dušnika ocijenjen je s „b.o.“ za sluznicu bez promjena, ocjena „zažarena“ za sluznicu s vidljivim crvenilom, a ocjena „otečena“ za sluznicu s vidljivim edemom. Količina sluzi ocijenjena je vrijednostima od 0 do 5 prema subjektivnoj procjeni kliničara koji je pregledavao konja, gdje je „0“ bila oznaka za suh i prazan dušnik, „1“ za rijetke grudice sluzi, „2“ za nalaz više grudica, „3“ za krpice sluzi, „4“ za tračke sluzi i „5“ za prisutnost guste, obilne sluzi po cijeloj površini pregledanog dušnika.

### **3.3. Citološki nalaz**

#### **3.3.1. Brojenje stanica**

Broj i vrsta stanica, određen je u najkvalitetnijem citološkom razmasku, u kojem je uzorak ispirka bio nanesen preko 30% do 50% površine predmetnog stakalca te je sadržavao stanice raspoređene u jednom sloju (Slika 1). Za odabir citološkog uzorka bitno je utjecala i očuvanost morfologije stanica na predmetnom stakalcu. Analizirani su direktni razmasci kao i razmasci ispiraka koji su prethodno centrifugirani. Fiksacija stanica provedena je sušenjem na zraku, a postupak bojenja standardnim protokolom za metodu po May Grünwald-Giemsu. U svakom od 32 odabrana citološka razmaska, diferencijalni broj stanica određen je brojanjem svih stanica prisutnih u pet vidnih polja na povećanju objektiva od 40 puta. Mikroskopski su određivane i brojane prvenstveno upalne stanice: neutrofilni granulociti (Slika 1), makrofagi (Slika 1), limfociti (Slika 2), eozinofilni granulociti (Slika 1) te mastociti. U populaciji neutrofilnih granulocita određen je udio stanica bez znakova degeneracije te udio degeneriranih stanica. Znakovi degenerativnih procesa izazvanih proteolitičkim enzimima (toksična destrukcija stanica) morfološki su određivani na temelju prisustva kariolize (otapanja jezgrinih elemenata). U populaciju makrofaga brojani su i uključeni binuklearni i multinuklearni stanični oblici, dok je u broj limfocita sačinjavao sve prisutne limfoblaste te male zrele limfocite. U pet vidnih polja svakog citološkog razmaska određen je i broj rezidencijalnih stanica (Slika 1), koje pripadaju populaciji stanica dišnih prohoda; vrčaste stanice i stanice pseudovišerednog epitela. Stanice unutar svakog vidnog polja su brojane samo jednom.

#### **3.3.2. Ocjena morfologije stanica**

Mikroskopskom pretragom prije brojenja stanica određen je opći stupanj očuvanosti morfologije stanica, odnosno gubitak rezolucije staničnih elemenata uzrokovan djelovanjem vlastitih proteolitičkih enzima (autoliza). Autoliza je posljedica „stajanja“ uzoraka prije fiksacije razmazaka sušenjem na zraku. Ocjena morfologije stanica rađena je prema sljedećim kriterijima: 1 = morfologija stanica u potpunosti očuvana (sve stanice je lako identificirati i brojati); 2 = očuvana je morfologija većine stanica (do 10% stanica u odabranim vidnim poljima se ne može identificirati); 3 = morfologija stanica je djelomično očuvana (do 50% stanica se ne može identificirati) i stanice je teško brojati; 4 = morfologija stanica nije očuvana (više od 70% stanica se ne može identificirati, uzorak je nemoguće brojati).

### **3.3.3. Određivanje staničnosti**

Ocjena staničnosti citološkog preparata je određena na povećanju objektiva mikroskopa od 4 puta. Pregledana je čitava površina predmetnog staklaca na kojoj je nanesen uzorak te je ocjenjena prema sljedećim kriterijima: 1 = niska staničnost (do 25% površine uzorka čine stanice); 2 = umjerena staničnost (od 25 do 50% površine uzorka čine stanice); 3 = visoka staničnost; (od 50 do 75% površine uzorka čine stanice); 4 = izrazito visoka staničnost (75 do 100% uzorka čine stanice).

### **3.3.4. Ocjena količine i morfologije sluzi**

Ocjena količine sluzi u citološkom razmasku je određena na povećanju objektiva mikroskopa od 4X puta. Pregledana je čitava površina predmetnog staklaca na kojoj je nanesen uzorak te je ocjenjena prema sljedećim kriterijima: 0 = sluz nije prisutna, 1 = niski udio sluzi (do 5% površine uzorka čini sluz); 2 = umjereni udio sluzi (6 do 15% površine uzorka čini sluz); 3 = visok udio sluzi; (16 do 30% površine uzorka čini sluz); 4 = izrazito visoki udio sluzi (više od 30% uzorka čini sluz). Prema izgledu sluz je svrstana u tri morfološke kategorije: amorfna sluz (Slika 2), u formi mangenta ili ljubičasto-plavih nepravilnih naslaga; fibrilarna sluz (Slika 2), u formi nepravilno naslaganih nitastih struktura ljubičaste boje, i Curschmannove uzvojnice (Slika 2), u formi spiralnih sluznih čepova mangenta ili ljubičaste boje. U svim uzorcima zabilježeno je prisustvo jedne, dvije ili sve tri forme sluznih nakupina.

### **3.3.5. Mikroskopska ocjena prisustva bakterija**

Ocjena bakterijske prisutnosti je određivana na čitavoj površini razmaska na povećanju objektiva 40 puta; 0 = bakterije nisu nađene; 1 = bakterije uočene povremeno (nakon pregleda više vidnih polja); 2 = umjereni broj bakterija (primjećene unutar nekoliko vidnih polja); 3 = obilno prisustvo bakterija (prisutne u većini vidnih polja).

## **3.4. Virusološka pretraga**

Za potrebe dokaza prisutnosti virusnih patogena iz ukupnog volumena 19 uzoraka ispiraka dušnika izolirana je ukupna DNK i RNK koje su izolirane iz uzoraka korištenjem komercijalnog kompleta QIAamp® cador® Pathogen® Mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) sukladno uputama proizvođača.

Svi uzorci pretraženi su na prisutnost najvažnijih virusnih patogena dišnog sustava konja koristeći PCR metodu za DNK viruse, odnosno PCR metodu s obrnutom

transkripcijom za dokaz RNK virusa (engl. *reverse transcription* PCR – RT-PCR). Za dokaz prisutnosti dva virusa korištena je RT-PCR metoda u stvarnom vremenu (engl. *real time* RT-PCR).

Za dokaz virusa iz porodice Herpesviridae korištena je prilagođena ugnježdjena PCR metoda opisana u DONALD i sur., 1996. Opisana metoda umnaža odsječak genoma veličine 215-315 baznih parova (bp) svih do danas poznatih herpesvirusa ljudi i životinja. Da bi se odredila točna pripadnost vrsti dokazanog herpesvirusa uzorci ispirka dušnika koji su dali pozitivnu reakciju na prisutnost herpesvirusa dalje su bili pretraženi PCR metodom YAMADA i sur., 2007., koja dokazuje prisutnost EHV-1 i/ili EHV-4 u uzorku. Ukoliko ova metoda nije dala pozitivan rezultat umnoženi odsječak virusnog genoma dobiven prvom opisanom metodom poslan je na određivanje nukleotidnog slijeda u Macrogen, Amsterdam, Nizozemska.

Prisutnost virusa iz roda Adenovirus dokazivana je korištenjem PCR metode opisane u THOMSON i sur., 2002. Pozitivnim su se smatrali uzorci koji su elektroforezom u gelu pokazali prisutnost umnoženog odsječka genoma veličine od 425 bp. Dokaz virusne RNK za viruse rinitsa konja A i B (engl. *Equine rhinitis virus A i B* – ERAV/ERBV) korištene su dvije metode opisane u JOHNSON i sur., 2012. Opisanim metodama RT-PCR-a prisutnost ERAV dokazana je ukoliko se elektroforezom u agaroznom gelu dokaže umnažanje odsječka genoma veličine 883 bp, odnosno za ERBV veličine 673 bp. Metodom RT-PCR-a izdvojena ukupna RNK iz uzoraka pretraživana je i na prisutnost virusa parainfluenze 3 goveda (engl. *Bovine parainfluenza virus 3* – BPIV-3), prema postupku opisanom u STOKES i sur., 1992 i STOREY i sur., 1987, za umnažanje odsječka virusnog genoma veličine 1009 bp. Metoda RT-PCR u stvarnom vremenu korištena je za dokaz virusa influence konja (engl. *Equine influenza virus* – EIV) i virusa virusnog arteritisa konja (engl. *Equine viral arteritis virus* – EVA). Metode su opisane u SPACKMAN i sur., 2002. i BALASURIYA i sur., 2002.

### **3.5. Statistička obrada rezultata**

#### **3.5.1. Grupiranje podataka za statističku obradu**

Temeljem anamnestičkih podataka i nalaza kliničkog pregleda za potrebe statističke analize životinje, od kojih su potjecali uzorci, su podijeljene u dvije skupine: skupina koja zadovoljava kriterije postavljanja kliničke sumnje na upalnu bolest dišnih prohoda

(skupina „IAD“), te skupina konja koji zbog određenog kriterija nisu mogli biti svrstani u prvu skupinu (skupina „OSTALI SINDROMI“). Iz razloga što su svi dostavljeni uzorci potjecali od konja koji su imali znakove oboljenja dišnog sustava u trajanju od najmanje dva tjedna te su svi endoskopskom pretragom imali povećanu količinu sluzi u dušniku, kao dodatni kriterij za svrstavanje konja u skupinu „IAD“ korištena je odsutnost povišene temperature (do 38,5 °C), broj udisaja u minuti u mirovanju unutar fizioloških granica (manji od 20). Broj udisaja u minuti uzet je kao objektivni pokazatelj otežanog disanja, a povišena tjelesna temperatura kao pokazatelj prisutnosti općeg infektivnog sindroma. Konji unutar skupine „OSTALI SINDROMI“ su dodatno podijeljeni na dvije podskupine, tako su konji s povećanim brojem udisaja u minuti uz fiziološke vrijednosti tjelesne temperature svrstani u podskupinu s kliničkom sumnjom na prisutnost rekurentne opstrukcije dišnih prohoda (podskupina „RAO“), dok su konji s povećanim brojem udisaja u minuti i povišenom tjelesnom temperaturom svrstani u podskupinu s kliničkom sumnjom na opći infektivski sindrom (podskupina „OIS“).

### **3.5.2. Statistička deskripcija i analiza**

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (data analysis software system), version 12. software.dell.com. (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike načinjena je i statistička analiza rezultata. S obzirom da promatrani podaci nisu pratili normalnu raspodjelu, ovisno o broju skupina, analizirani su Mann-Whitney U testom i Kruskal-Wallis analizom varijance (ANOVA) te zatim Tukey HSD testom za nejednaki broj (N) uzoraka kao i metodom faktorijalne ANOVA-e. Kvalitativne varijable, učestalosti, obrađene su hi-kvadrat testom. Razina značajnosti u ovom istraživanju bila je  $p=0,05$ .



## **4. REZULTATI**

### ***4.1. Rezultati kliničkog pregleda***

Razvrstavanjem kliničkih nalaza prema preporuci „ACVIM Consensus Statement-engl.“ u skupinu „IAD“ uvršteno je 14 konja, devet mužjaka i pet ženki, u dobnom rasponu od dvije do 20 godina, različitih pasmina (Tablica 2). Raspon vrijednosti tjelesne temperature kretao se od 37,5 do 38°C s rasponom broja otkucaja srca u minuti od 30 do 40 i brojem udisaja u minuti od 12 do 20. Kašalj je zabilježen u svih konja i to u trajanju od dva tjedna do 12 mjeseci, od toga su samo tri konja pokazivala znakove otežanog disanja prema iskazu vlasnika, a iscjedak iz nosa je zabilježen u pet konja. Auskultatorni nalaz pluća nije pokazao odstupanja od fiziološkog nalaza u nijednog konja ove skupine. Endoskopskom pretragom nađene su promjene u izgledu sluznice dušnika u pet konja, dok se količina vidljive sluzi u dušniku kretala od nula do pet, gdje je suh i prazan dušnik nađen kod jednog konja, rijetke grudice sluzi u deset konja, više grudica sluzi u jednog konja, krpice sluzi u jednog konja te gusta i obilna sluz također u samo jednog konja. Šest konja liječeno je isključivo antibioticima duže vremena, dok je jedan uz antibiotike primao i mukolitik, a za sedam konja nema podataka o liječenju (Tablica 2).

**Tablica 2. Rezultati kliničke pretrage konja – skupina „IAD“**

Broj Uzorka n=14	Spol	Dob	Pasmina	Temp	Bilo	Disanje	Kašalj	Iscjedak	Otežano Disanje	Auskultacija	Trajanje (Mj)	Dušnik (E)	Sluz (E) (1-5)	Liječenje
8	M	8	hr.toplokrvnjak	38	40	15	DA	NE	NE	0	1,0	b.o.	1	/
12	M	/	/	37,5	32	20	DA	DA	NE	0	6+	Zažaren	5	M*,ATB
15	M	20	quarter horse	38	32	12	DA	NE	NE	0	1,0	b.o.	1	/
16	Ž	12	holstein	38	42	16	DA	NE	NE	0	12,0	b.o.	1	ATB <sup>#</sup>
18	Ž	6	belgijski toplokrvnjak	38	35	18	DA	DA	DA	0	1,5	Zažaren	3	ATB
19	M	12	/	38	35	12	DA	DA	NE	0	0,8	b.o.	0	/
21	M	10	holstein	38	40	15	DA	NE	NE	0	5,0	Zažaren	1	/
26	Ž	7	HŠK	38	38	15	DA	NE	NE	0	2,0	b.o.	1	ATB
28	M	16	oldenbourg	38	30	20	DA	NE	DA	0	3,0	Zažaren	1	ATB
29	Ž	12	hr.toplokrvnjak	38	40	13	DA	NE	NE	0	3,0	b.o.	1	/
36	M	11	hr.toplokrvnjak	38	40	15	DA	DA	NE	0	3,0	Zažaren	2	ATB
38	M	8	HŠK	38	40	16	DA	NE	DA	0	1,0	b.o.	1	/
39	M	10	holstein	37,6	32	16	DA	DA	NE	0	0,5	b.o.	1	/
41	Ž	2	engl. punokrvnjak	38	35	15	DA	NE	NE	0	1,5	b.o.	1	ATB

M\* = primjenjen mukolitik, ATB<sup>#</sup> = primjenjen antibiotik

U skupinu „OSTALI SINDROMI“ uvršteno je 18 konja različitih pasmina (osam mužjaka i deset ženki), u dobnom rasponu od sedam do 20 godina (Tablica 3). Vrijednosti tjelesne temperature konja kao kriterij podjele unutar skupine „OSTALI SINDROMI“ kretale su se od 37,1 do 39,5°C, s fiziološkim temperaturnim rasponom od 37,1 do 38°C u deset konja svrstanih u podskupinu „RAO“ i povišenom tjelesnom temperaturom, u rasponu od 39 do 39,5°C, u osam konja svrstanih u podskupinu „OIS“. Broj otkucaja srca u minuti nije bio u korelaciji s povišenjem temperature, vrijednosti su se kretale od 30 do 56 otkucaja u minuti. Svi konji ove skupine su imali povećanu učestalost disanja u mirovanju u rasponu od 25 do 45 udisaja u minuti. Kroničan kašalj u konja ove skupine je trajao od jednog do 36 mjeseci. Iscjedak iz nosa je uočen u 14 konja, osam iz podskupine „RAO“ i šest iz podskupine „OIS“. Znakove otežanog disanja prema iskazu vlasnika pokazivalo je 15 konja, osam unutar podskupine „RAO“ i sedam unutar podskupine „OIS“. Auskultatorni nalaz nad plućima bio je bez osobitosti u dva konja iz podskupine „RAO“ i dva konja iz podskupine „OIS“, a pooštren dišni šum zabilježen je u četiri konja iz podskupine „RAO“ i samo jednog konja iz podskupine „OIS“, dok su hropci i kreptacije nađeni u četiri konja iz podskupine „RAO“ i pet konja iz podskupine „OIS“. Endoskopski nalaz edema sluznice dušnika nađen je u četiri konja iz podskupine „RAO“ te nije utvrđen u podskupini „OIS“. Crvenilo odnosno zažarenost sluznice je utvrđeno u četiri konja iz podskupine „RAO“ i u šest konja iz podskupine „OIS“. U svakoj podskupini bila su po dva konja urednog nalaza izgleda sluznice dušnika. U podskupini „RAO“ u osam konja je nađena gusta i obilna količina sluzi u dušniku, dok su u dva konja iz te podskupine nađene rijetke grudice sluzi. U podskupini „OIS“ u dva konja su nađene rijetke grudice sluzi, u jednog konja je nađeno više grudica sluzi, u tri konja su nađene krpice sluzi, u jednog konja su nađeni tračci sluzi i također u samo jednog konja je bila prisutna gusta i obilna sluz po cijeloj površini dušnika. Šest konja podskupine „RAO“ je duže vremena liječeno antibioticima, jedan konj steroidnim protuupalnim lijekovima, a za preostala tri konja nema podataka o liječenju. Šest konja iz podskupine „OIS“ dobivalo je antibiotike, za jednog konja nema podataka, dok se za jednog konja pouzdano zna da nije bio terapiran (Tablica 3).

**Tablica 3. Rezultati kliničke pretrage – skupina „OSTALI SINDROMI“ (s podjelom na podskupinu „RAO“ i „OIS“)**

Broj Uzorka	Spol	Dob	Pasma	Temp	Bilo	Disanje	Kašalj	Iscjedak	Otežano Disanje	Auskultacija	Trajanje (Mj)	Dušnik (E)	Sluz (E) (1-5)	Liječenje
1	Ž	10	hrvatski kasač	37,1	44	29	DA	DA	DA	1	2	Otečen	5	ATB#
23	Ž	10	hrvatski kasač	37,1	44	29	DA	DA	DA	1	3	Otečen	5	ATB
5	Ž	10	/	37,2	56	40	DA	DA	DA	2	3+	Zažare	5	/
27	M	20	/	37,2	36	40	DA	NE	DA	1	3	Zažaren	5	/
14	Ž	10	hr.toplokrvnjak	37,5	44	48	DA	DA	DA	2	4	Zažaren	5	P*
30	Ž	9	hrv.jahači poni	37,5	36	32	DA	NE	DA	1	1	Zažaren	5	ATB
31	M	10	arapski punokrvnjak	37,5	50	25	DA	DA	DA	2	1,5	Otečen	5	ATB
10	Ž	14	/	38	30	38	DA	DA	NE	2	4	Otečen	5	ATB
20	Ž	9	slovenski toplokrvnjak	38	40	25	DA	DA	NE	0	2	b.o.	1	/
35	M	10	hr.hladnokrvnjak	38	42	25	DA	DA	DA	0	1	b.o.	1	ATB
2	Ž	13	arapski punokrvnjak	39	45	45	DA	DA	DA	2	2	Zažaren	3	ATB
4	M	7	trakener	39	45	30	DA	NE	DA	0	1	Zažaren	3	ATB
7	M	12	quarter horse	39	40	35	DA	DA	DA	2	3	b.o.	1	/
9	Ž	10	frizijski konj	39	50	40	DA	DA	DA	2	36	Zažaren	4	ATB
25	M	15	hr.toplokrvnjak	39	42	25	DA	DA	DA	0	2	b.o.	1	ATB
37	M	12	arapski punokrvnjak	39	50	35	DA	DA	DA	2	2	Zažaren	2	ATB
13	Ž	10	hr.toplokrvnjak	39,5	50	45	DA	NE	DA	2	1,5	Zažaren	3	ATB
3	M	10	/	39,5	32	28	DA	DA	NE	1	5	Zažaren	5	NE

ATB #=primjenjen antibiotik, P\*= primjenjeni steroidni protuupalni lijekovi

#### 4.2. Rezultati citološke pretrage

Unutar skupine „IAD“ staničnost je ocjenjena kao niska (ocjena 1) u tri citološka uzorka, kao umjerena (ocjena 2) u četiri citološka uzorka, kao visoka (ocjena 3) u dva citološka uzorka i kao izrazito visoka (ocjena 4) u pet citoloških uzoraka (Tablica 4). Morfologija stanica je bila potpuno očuvana (ocjena 1) u tri citološka uzorka, većina stanica je bila očuvana (ocjena 2) u sedam citoloških uzoraka, a u četiri citološka uzorka je morfologija bila djelomično očuvana (ocjena 3) te nije bilo uzorka u kojem morfologija nije bila očuvana (ocjena 4). Bakterije nisu uočene (ocjena 0) u sedam citoloških uzoraka, povremeno su uočljive (ocjena 1) u šest citoloških uzoraka, a u jednom citološkom uzorku je uočeno obilno prisustvo bakterija (ocjena 3). Sluz nije bila prisutna (ocjena 0) u dva citološka uzorka, nizak udio sluzi (ocjena 1) je zabilježen u tri citološka uzorka, umjeren udio sluzi (ocjena 2) u dva citološka uzorka, visok udio sluzi (ocjena 3) u šest citoloških uzoraka i izrazito visok udio sluzi (ocjena 4) u jednom citološkom uzorku. Amorfnu sluz je prisutna u devet citoloških uzoraka, fibrilarna sluz je prisutna u deset citoloških uzoraka, a Curshmanove uzvojnice su prisutne u šest citoloških uzoraka (Tablica 4).

**Tablica 4. Prikaz kvalitete citoloških razmazaka konja iz skupine IAD.**

Broj Uzorka	Staničnost (1-4)	Morfologija (1-4)	Nalaz Bakterija (0-3)	Količina Sluzi	Amorfna sluz	Fibrilarna sluz	Curshmanove uzvojnice
8	1	3	1	0	-	-	-
12	4	2	3	1	+	-	-
15	4	1	0	2	+	-	-
16	2	3	0	3	+	+	+
18	2	2	0	2	+	+	-
19	4	2	1	1	-	+	-
21	3	3	0	3	-	+	+
26	4	2	1	4	-	+	+
28	1	1	1	1	+	+	-
29	1	2	1	0	-	-	-
36	4	3	0	3	+	+	-
38	3	1	0	3	+	+	+
39	2	2	0	3	+	+	+
41	2	2	1	3	+	+	+

Unutar skupine „OSTALI SINDROMI“ staničnost je ocjenjena kao niska (ocjena 1) u četiri citološka uzorka, kao umjerena (ocjena 2) u četiri citološka uzorka, kao visoka (ocjena 3) u tri citološka uzorka i kao izrazito visoka (ocjena 4) u sedam citoloških uzoraka (Tablica 5). Morfologija stanica je bila potpuno očuvana (ocjena 1) u tri citološka uzorka, većina stanica je bila očuvana (ocjena 2) u deset citoloških uzoraka, a u pet citoloških uzoraka je morfologija bila djelomično očuvana (ocjena 3) te nije bilo uzorka u kojem morfologija nije bila očuvana (ocjena 4). Bakterije nisu uočene (ocjena 0) u jedanaest citoloških uzoraka, bakterije su povremeno uočljive (ocjena 1) u četiri citološka uzorka, umjereno prisutstvo bakterija (ocjena 2) je zabilježeno u dva citološka uzorka, a u jednom citološkom uzorku bio je prisutan veliki broj bakterija (ocjena 3). Sluz nije bila prisutna (ocjena 0) u jednom citološkom uzorku, nizak udio sluzi (ocjena 1) je zabilježen u šest citoloških uzoraka, umjeren udio sluzi (ocjena 2) u pet citoloških uzoraka, visok udio sluzi (ocjena 3) u dva citološka uzorka i izrazito visok udio sluzi (ocjena 4) u četiri citološka uzorka. Amorfnu sluz je prisutna u jedanaest citoloških uzoraka, fibrilarna sluz je prisutna u četrnaest citoloških uzoraka, a Curshmanove uzvojnice su prisutne u jedanaest citoloških uzoraka (Tablica 5).

**Tablica 5. Prikaz kvalitete citoloških razmazaka konja iz skupine OSTALI SINDROMI.**

	Broj Uzorka	Staničnost (1-4)	Morfologija (1-4)	Nalaz Bakterija (0-3)	Količina Sluzi	Amorfna sluz	Fibrilarna sluz	Curshmanove uzvojnice
RAO	1	4	3	2	1	+	+	-
	23	2	2	1	1	-	+	+
	5	1	3	0	4	+	+	+
	27	2	2	0	4	-	+	+
	14	4	1	0	2	+	+	+
	30	4	2	2	4	+	+	+
	31	4	3	0	2	+	+	-
	10	1	2	0	1	+	-	-
	20	1	3	1	0	-	-	-
	35	2	2	1	4	+	+	+
OIS	2	3	2	3	3	+	+	+
	3	1	2	0	1	-	+	-
	4	4	2	0	2	+	+	+
	7	4	2	0	2	+	-	-
	9	4	1	0	2	-	+	+
	13	2	2	1	1	+	-	+
	25	3	3	0	1	-	+	-
	37	3	1	0	3	-	+	+

Unutar skupine „IAD“ dominantan stanični tip u trinaest uzoraka čine neutrofilni granulociti čiji se udio kreće od 49.84% do 95.46%, dok je udio neutrofilnih granulocita u jednom uzorku 12.84%; srednja vrijednost neutrofilnih granulocita ove skupine je  $80.65\% \pm 15.70\%$  (Tablica 6). Degenerirani neutrofilni granulociti pronađeni su u osam uzoraka ove skupine s udjelom od 6.45% do 100.0%; srednja vrijednost degeneriranih neutrofilnih granulocita skupine je  $36.92\% \pm 41.34\%$ . Makrofagi su pronađeni u svim uzorcima ove skupine s udjelom od 3.03% do 41.22%; srednja vrijednost makrofaga skupine je  $11.63\% \pm 9.96\%$ . Eozinofilni granulociti su pronađeni u tri uzorka s udjelom od 1.35% do 3.15%; srednja vrijednost eozinofilnih granulocita skupine je  $0.35\% \pm 0.93\%$ . Limfociti su pronađeni u dvanaest uzoraka s udjelom od 0.42% do 44.60%; srednja vrijednost limfocita skupine je  $5.08\% \pm 6.74\%$ . Mastociti kao najrjeđi stanični tip su pronađeni u samo jednom uzorku ove skupine s udjelom od 0.31%; srednja vrijednost mastocita skupine je  $0.02\% \pm 0.09\%$ . Rezidencijalne stanice su pronađene u osam uzoraka ove skupine s udjelom od 0.38% do 9.12%; srednja vrijednost rezidencijalnih stanica skupine je  $2.27\% \pm 3.17\%$  (Tablica 6).

Unutar skupine „OSTALI SINDROMI“ dominantan stanični tip svih osamnaest uzoraka čine neutrofilni granulociti čiji se udio kreće od 62.81% do 99.78%; srednja vrijednost neutrofilnih granulocita ove skupine je  $87,36\% \pm 12,02\%$ . Degenerirani neutrofilni granulociti pronađeni su u osam uzoraka ove skupine s udjelom od 9.41% do 100.0%; srednja vrijednost degeneriranih neutrofilnih granulocita skupine je  $34,97\% \pm 44,78\%$ . Makrofagi su pronađeni u sedamnaest uzoraka ove skupine s udjelom od 0.22% do 21.49%, dok u jednom uzorku makrofagi nisu pronađeni; srednja vrijednost makrofaga skupine je  $6,17\% \pm 7,28\%$ . Eozinofilni granulociti su pronađeni u šest uzoraka s udjelom od 0.06% do 0.70%; srednja vrijednost eozinofilnih granulocita skupine je  $0,11\% \pm 0,21\%$ . Limfociti su pronađeni u sedamnaest uzoraka s udjelom od 0.16% do 15.60%; srednja vrijednost limfocita skupine je  $5,43\% \pm 5,16\%$ . Mastociti kao najrjeđi stanični tip i ove skupine su pronađeni u tri uzorka s udjelom od 0.13% do 2.66%; srednja vrijednost mastocita skupine je  $0,21\% \pm 0,66\%$ . Rezidencijalne stanice su pronađene u šest uzoraka ove skupine s udjelom od 0.53% do 4.63%; srednja vrijednost rezidencijalnih stanica skupine je  $0,76\% \pm 1,49\%$  (Tablica 6).

Unutar podskupine „RAO“ dominantan stanični tip svih deset uzoraka čine neutrofilni granulociti čiji se udio kreće od 92.96% do 99.78%; srednja vrijednost neutrofilnih granulocita ove skupine je  $85,57\% \pm 11,67\%$ . Degenerirani neutrofilni granulociti pronađeni su u pet uzoraka ove skupine s udjelom od 59.18% do 100.0%; srednja vrijednost degeneriranih neutrofilnih granulocita skupine je  $24,58\% \pm 41,33\%$ . Makrofagi su pronađeni

u devet uzoraka ove skupine s udjelom od 0.22% do 3.54%; srednja vrijednost makrofaga skupine je  $6,74\% \pm 7,12\%$ . Eozinofilni granulociti su pronađeni u pet uzoraka s udjelom od 0.06% do 0.53%; srednja vrijednost eozinofilnih granulocita skupine je  $0,12\% \pm 0,26\%$ . Limfociti su pronađeni u devet uzoraka s udjelom od 0.16% do 5.11%; srednja vrijednost limfocita skupine je  $6,50\% \pm 5,84\%$ . Mastociti su pronađeni u dva uzorka s udjelom od 0.13% do 0.81%; srednja vrijednost mastocita skupine je  $0,27\% \pm 0,84\%$ . Rezidencijalne stanice su pronađene u jednom uzorku ove skupine s udjelom od 0.65%; srednja vrijednost rezidencijalnih stanica skupine je  $0,88\% \pm 1,52\%$  (Tablica 6).

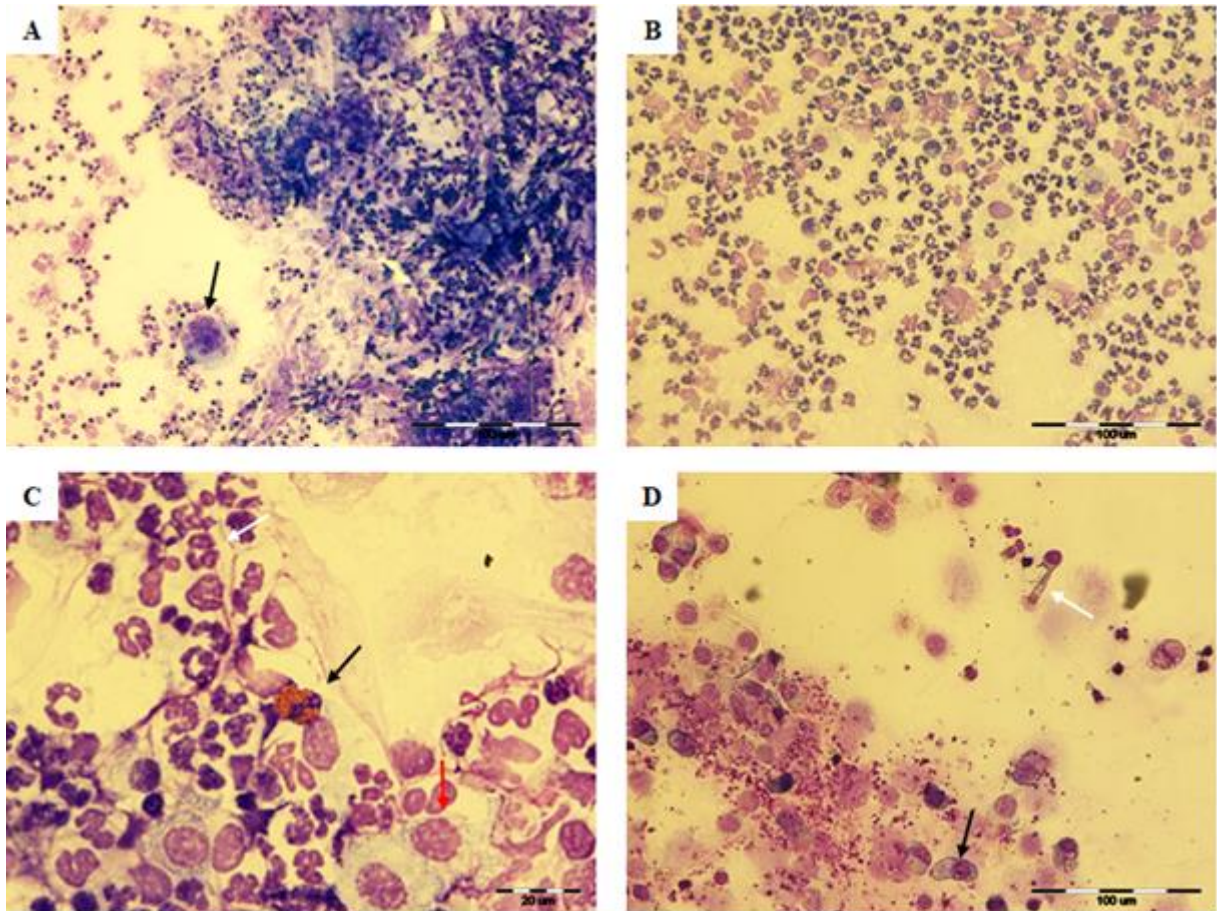
Unutar podskupine „OIS“ dominantan stanični tip svih osam uzoraka čine neutrofilni granulociti čiji se udio kreće od 62.81% do 88.89%; srednja vrijednost neutrofilnih granulocita ove skupine je  $89,93\% \pm 12,95\%$ . Degenerirani neutrofilni granulociti pronađeni su u tri uzorka ove skupine s udjelom od 9.41% do 100.0%; srednja vrijednost degeneriranih neutrofilnih granulocita skupine je  $49,81\% \pm 48,47\%$ . Makrofagi su pronađeni u svim uzorcima ove skupine s udjelom od 2.78% do 21.49%; srednja vrijednost makrofaga skupine je  $5,36\% \pm 8,02\%$ . Eozinofilni granulociti su pronađeni u jednom uzorku s udjelom od 0.70%; srednja vrijednost eozinofilnih granulocita skupine je  $0,10\% \pm 0,12\%$ . Limfociti su pronađeni svim uzorcima skupine s udjelom od 3.19% do 15.60%; srednja vrijednost limfocita skupine je  $3,89\% \pm 3,88\%$ . Mastociti su pronađeni u jednom uzorku s udjelom od 2.66%; srednja vrijednost mastocita skupine je  $0,13\% \pm 0,30\%$ . Rezidencijalne stanice su pronađene u pet uzoraka ove skupine s udjelom od 0.53% do 4.63%; srednja vrijednost rezidencijalnih stanica skupine je  $0,59\% \pm 1,56\%$  (Tablica 6).

**Tablica 6. Prikaz udjela staničnih tipova prema podjeli u kliničke sindrome.**

	IAD		RAO		OIS		OSTALI SINDROMI	
	%	X	SD	X	SD	X	SD	X
<b>N<sup>1</sup></b>	80,65%	15,70%	85,57%	11,67%	89,93%	12,95%	87,36%	12,02%
<b>DN<sup>2</sup></b>	36,92%	41,34%	24,58%	41,33%	49,81%	48,47%	34,97%	44,78%
<b>M<sup>3</sup></b>	11,63%	9,96%	6,74%	7,12%	5,36%	8,02%	6,17%	7,28%
<b>E<sup>4</sup></b>	0,35%	0,93%	0,12%	0,26%	0,10%	0,12%	0,11%	0,21%
<b>L<sup>5</sup></b>	5,08%	6,74%	6,50%	5,84%	3,89%	3,88%	5,43%	5,16%
<b>MS<sup>6</sup></b>	0,02%	0,09%	0,27%	0,84%	0,13%	0,30%	0,21%	0,66%
<b>RS<sup>7</sup></b>	2,27%	3,17%	0,88%	1,52%	0,59%	1,56%	0,76%	1,49%

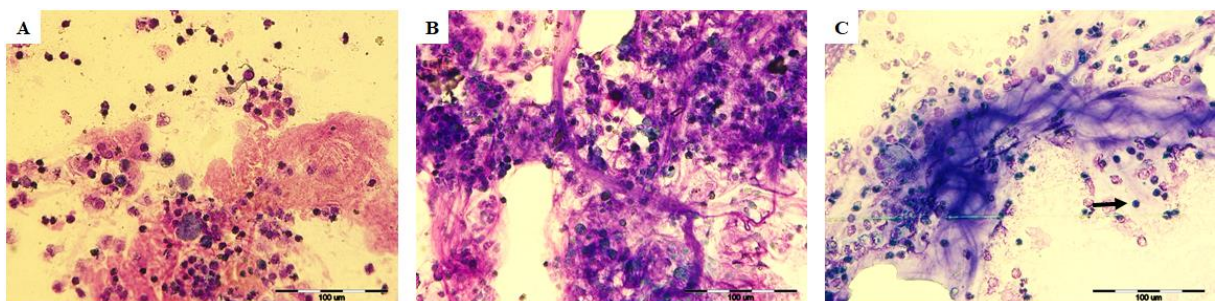
**N<sup>1</sup>** = neutrofilni granulociti, **DN<sup>2</sup>** = udio degeneriranih neutrofilnih granulocita, **M<sup>3</sup>** = makrofagi, **E<sup>4</sup>** = eozinofilni granulociti, **L<sup>5</sup>** = limfociti, **MS<sup>6</sup>** = mastociti, **RS<sup>7</sup>** = rezidencijalne stanice





### Slika 1. Prikaz najznačajnijih citoloških nalaza

A: *konj 31*. Prikaz velikog broja stanica gusto uklopljenih u sluz koje je nemoguće brojati. Crnom strelicom označena multinuklearna divovska stanica; May Grünwald-Giemsa X40. B: *konj 14*. Prikaz populacije neutrofilnih granulocita (sa i bez znakova degeneracije) i mononuklearnih makrofaga raspoređenih u jednom sloju; May Grünwald-Giemsa X40. C: *konj 29*. Prikaz izgleda populacije stanica. Neutrofilni granulocit označen bijelom strelicom, eozinofilni granulocit označen crnom strelicom i mononuklearni makrofag označen crvenom strelicom; May Grünwald-Giemsa X100. D: *konj 9*. Prikaz populacije rezidencijalnih stanica. Stanica pseudovišeslojnog epitela s cilijama označena bijelom strelicom i vrčasta stanica označena crnom strelicom; May Grünwald-Giemsa X40.

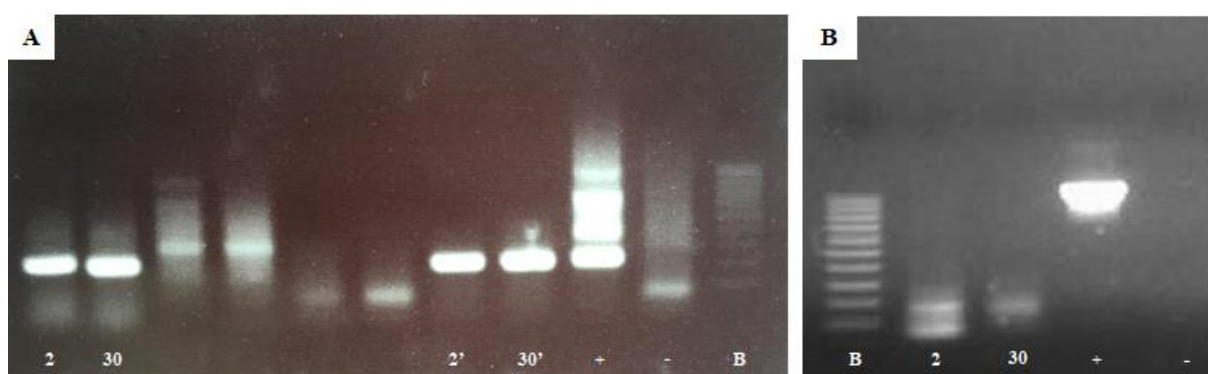


### Slika 2. Prikaz citološkog izgleda sluzi

A: *konj 36*. Prikaz izgleda amorfnog sluzi; May Grünwald-Giemsa X40. B: *konj 36*. Prikaz izgleda fibrilarne sluzi; May Grünwald-Giemsa 40X. C: *konj 31*. Prikaz izgleda Curschmannovih uzvojnica. Limfocit označen crnom strelicom; May Grünwald-Giemsa X40.

### 4.3. Rezultati virusološke pretrage

Pretraživanjem predmetnih uzoraka molekularnim metodama, nije dokazana prisutnost sljedećih virusnih uzročnika: EAV, EIV, BPI-3, ERAV, ERBV i adenovirusa, ali je u dva uzorka dokazana prisutnost DNK virusa iz porodice Herpesviridae (Slika 3). Pozitivni uzorci su nakon pozitivnog rezultata bili ponovno pretraženi PCR metodom za dokaz EHV-1 i EHV-4 u kojoj su dali negativan rezultat (Slika 3). S ciljem određivanja točne identifikacije dokazanih herpesvirusa umnoženi odsječak genoma dobiven prvom PCR metodom upućen je na određivanje slijeda nukleotida, a analizom dobivenih rezultata ustanovljeno je da oba uzorka sadrže virusnu DNK konjskog herpesvirusa 5 (*Equine Herpesvirus-5*, EHV-5).



**Slika 3. Prikaz najvažnijih rezultata dobivenih PCR metodom**

A: Prisutnost genoma uzročnika iz porodice Herpesviridae u pretraživanim uzorcima. Umnoženi odsječak svojim položajem odgovara segmentu DNK veličine 215-315 bp.

B: Negativan nalaz pretraživanih uzoraka na prisutnost EHV-1 i EHV-4.

+ = pozitivna kontrola; - = negativna kontrola; B = biljeg; 2 = konj broj 2; 30 = konj broj 30, 2' = konj broj 2 u duplikatu; 30' = konj broj 30 u duplikatu.

### 4.4. Rezultati statističke obrade

Statističkom obradom podataka s obzirom na spol nije pronađena statistički značajna razlika između skupine „IAD“ i skupine „OSTALI SINDROMI“. Ukoliko se promatra prisutnost iscjetka iz nosa, iz dobivenih rezultata je vidljivo da se u konja skupine „IAD“ iscjedak javljao u statistički značajno manjem broju nego u konja skupine „OSTALI SINDROMI“ ( $\chi^2$  p=0,02). Statistički značajno veći broj konja koji su otežano disali po subjektivnom dojmu vlasnika ( $\chi^2$  p=0,0005) se nalazi unutar skupine „OSTALI SINDROMI“, uz značajno veću prisutnost promjenjenog auskultacijskog nalaza nad plućima u konja ove skupine ( $\chi^2$ , p=0,00001) u odnosu na skupinu „IAD“.

Obradom podataka o izgledu sluznice dušnika utvrđeno je da se unutar skupine „IAD“ nalazi statistički značajno veći broj konja bez vidljivih promjena na sluznici te niti jedan konj s

otečenjem sluznice ( $\chi^2 p=0,03$ ) u odnosu na skupinu „OSTALI SINDROMI“. Endoskopski nalaz sluzi je bio statistički značajno manji u skupini „IAD“ nego u skupini „OSTALI SINDROMI“, odnosno u skupini „IAD“ bilo je značajno više konja sa suhim i praznim dušnikom ili s prisutnim rijetkim grudicama sluzi (ocjena 0 i 1) u odnosu na skupinu „OSTALI SINDROMI“ gdje je bilo više konja kod kojih je uočena gusta i obilna količina sluz po cijeloj površini dušnika (ocjena 5) ( $\chi^2 p=0,04$ ).

Podjelom skupine „OSTALI SINDROMI“ u dvije podskupine, dobili smo statistički značajno veći broj životinja s otežanim disanjem i u podskupini „RAO“ i u podskupini „OIS“ u odnosu na skupinu „IAD“ ( $\chi^2 p=0,0006$ ). Usporedbom endoskopskog nalaza izgleda sluznice dušnika ustanovljeno je da se sluznica bez znakova upale daleko češće javlja u skupini „IAD“ u odnosu na podskupine „RAO“ i „OIS“, dok se nalaz otečene sluznice javlja isključivo u konja iz podskupine „RAO“ ( $\chi^2 p=0,012$ ). Daleko veća količina sluzi vidljiva endoskopom je zabilježena u podskupini „RAO“ u odnosu na podskupinu „OIS“ i osobito u odnosu na skupinu „IAD“ ( $\chi^2 p=0,0009$ ).

Uspoređujući udjele pojedinih vrsta stanica ustanovljenih citološkom pretragom nisu nađene statistički značajne razlike između skupina „IAD“ i „OSTALI SINDROMI“ te skupine „IAD“ s podskupinama „RAO“ i „OIS“ prema vrijednostima postotnog udjela neutrofilnih granulocita, limfocita i eozinofilnih granulocita. Statistički nije ustanovljena razlika u udjelu degeneriranih neutrofilnih granulocita, međutim statistički je značajan veći postotni udio makrofaga u uzorcima iz skupine „IAD“ u odnosu na skupinu „OSTALI SINDROMI“ (Mann-Whitney U test  $p=0,04$ ).

Ukoliko se gleda udio eozinofilnih granulocita u uzorku u odnosu na prisutnost odnosno odsutnost Curshmanovih uzvojnica, pronađena je tendencija većem broju eozinofila ukoliko su one prisutne (Mann-Whitney U test  $p=0,08$ ). Pronađena je i tendencija da je udio neutrofilnih granulocita manji kod prisutnosti fibrilarne sluzi (Mann-Whitney U test  $p=0,08$ ).

## 5. RASPRAVA

Bolesti dišnog sustava imaju izrazit značaj u konjskoj industriji jer uzrokuju velike ekonomske gubitke. Kronična upalna stanja dišnog sustava, poput rekurentne opstrukcije dišnih prohoda i upalne bolesti dišnih prohoda su jedna od najčešćih patoloških stanja u konja, koja zbog nespecifičnosti u kliničkom očitovanju često nisu pravovremeno prepoznata niti adekvatno liječena (ROSSDALE i sur., 1985.; RICHARD i sur., 2010.). Oba stanja predstavljaju sindrome nezaraznih upala donjih dišnih prohoda koja se klinički očituju smanjenom radnom sposobnosti konja s kroničnim ili intermitentnim kašljem (COUËTIL i sur., 2016.). Čak i iskusnijem kliničaru, na prvi pogled, ova dva sindroma mogu djelovati gotovo istovjetno međutim pažljivo uzimanje podataka nacionala, anamneze kao i nalaz općeg kliničkog pregleda mogu pomoći u njihovom međusobnom razlikovanju te razlikovanju od ostalih patoloških promjena na donjim dišnim putevima konja. Jedna od osnovnih razlika između upalne bolesti dišnih prohoda i rekurentne bolesti dišnih prohoda je dob životinje. Rekurentna opstrukcija dišnih prohoda pogađa konje starije od sedam godina, a upalna bolest dišnih prohoda se može javiti u konja bilo koje dobi (CHRISTLEY i sur., 2001.; COUËTIL i WARD, 2003.; ROBINSON i sur., 2003.). Osim po dobi, navedeni sindromi se razlikuju i po učestalosti napadaja kašlja i po broju udisaja u mirovanju, gdje se kod konja s rekurentnom opstrukcijom napadaji kašlja javljaju češće i uz povišenu učestalost udisaja u mirovanju, dok se kod konja s upalnom bolesti dišnih prohoda napadaji kašlja javljaju povremeno bez napora pri disanju uz fiziološki broj udisaja u minuti u mirovanju (COUËTIL i sur., 2016.). Navedene sindrome je potrebno razlikovati i od infekcija dišnog sustava jer se one mogu očitovati jednako nespecifičnim kliničkim znakovima, no povećan broj udisaja u mirovanju uz prisutnost kašlja i općeg infekcijskog sindroma jasno isključuje rekurentnu opstrukciju i upalnu bolest dišnih prohoda kao moguću dijagnozu (COUËTIL i sur., 2007.). Endoskopska pretraga predstavlja nadopunu klasičnog kliničkog pregleda jer omogućava cjelovitiji pregled dišnog sustava tijekom kojeg se dobiva uvid u izgled sluznice dišnih prohoda uz određivanje prisutnosti i procjenu količine sluzi. Za pristup dubljim dijelovima pluća potreban je endoskop s kateterom duljine najmanje dva metra, što često nije moguće u terenskim uvjetima zbog nedostupnosti ovakve opreme i invazivnosti zahvata. Zato se u ovim slučajevima primjenjuju kraći endoskopi kojima se može pregledati isključivo dio dušnika konja. Prema dostupnim podacima vrijednosti endoskopske pretrage, kod kroničnih oboljenja dišnog sustava konja, su ograničene. Podaci o izgledu sluznice se ne navode kao značajan dijagnostički parametar, a s obzirom da se prekomjerno nakupljanje sluzi uočava

endoskopskom pretragom u oba sindroma, na temelju tog nalaza ih je nemoguće razlikovati (GERBER i sur., 2004.).

U ovom istraživanju na osnovu anamnestičkih podataka (dob, trajanje kliničkih znakova i prisutnosti kašlja) te kliničkih podataka (vrijednosti trijasa, pojava znakova otežanog disanja i nalaz povećane količine sluzi endoskopskom pretragom) od 32 konja uključena u ovo istraživanje 14 je zadovoljavalo kriterije za upalnu bolest dišnih prohoda. Od preostalih 18 konja, osam je svrstano u podskupinu konja sa sumnjom na infekciju donjih dišnih prohoda zbog povišene tjelesne temperature u trenutku kliničkog pregleda (podskupina „OIS“), a deset je svrstano u skupinu konja sa sumnjom na rekurentnu opstrukciju dišnih prohoda (podskupina „RAO“) jer se povećan broj udisaja u minuti smatrao objektivnim pokazateljem otežanog disanja u mirovanju. Navedeni podaci su neosporan dokaz da su rekurentna opstrukcija i upalna bolest dišnih prohoda prisutne u značajnog broja konja na području Republike Hrvatske međutim prema mojim spoznajama ne postoje noviji podaci o proširenosti i značaju ovih bolesti u našoj zemlji. Po drugoj strani relativno mali broj dostavljenih uzoraka za vrijeme trajanja ovog istraživanja govori u prilog činjenici da navedeni sindromi u većine konja ostaju nedijagnosticirani i posljedično tome nepravilno liječeni.

Pogodnim za statističku obradu, od podataka nacionala, bili su samo podaci o spolu, ali nije dokazana spolna predispozicija za navedene sindrome, što odgovara podacima u istraživanjima drugih autora (DIXON i sur., 1995.). Iz anamnestičkih podataka, za razliku od dostupnih podataka u literaturi, ovo istraživanje je pokazalo da se iscjedak iz nosa puno rjeđe javlja u konja s postavljenom kliničkom sumnjom na upalnu bolest dišnih prohoda nego u konja sa sumnjom na rekurentnu opstrukciju ili infekciju donjih dišnih prohoda. Uz navedeno, iz anamneze, unutar skupine „IAD“ se nalazi značajno manji broj konja kod kojih je i po subjektivnoj ocjeni vlasnika bilo prisutno otežano disanje te niti jedan konj s promijenjenim auskultacijskim nalazom nad plućima za razliku od podskupina „RAO“ i „OIS“. Vjerojatan razlog je u patogenezi i opsežnosti promjena kod ova tri opisivana sindroma. U osnovi rekurentne opstrukcije dišnih prohoda su opsežne i kronične promjene, za razliku od promjena koje se uočavaju u konja koji boluju od upalne bolesti dišnih prohoda, što može objasniti češće vidljiv iscjedak iz nosa u konja te izraženo otežano disanje koje uočava i vlasnik u konja koji boluju od ovog sindroma. U prilog ovom zaključku ide i promjenjen auskultatorni nalaz nad plućima u konja s rekurentnom opstrukcijom dišnih prohoda.



Vrlo značajno, ovo istraživanje je nedvojbeno pokazalo da endoskopski pregled, učinjen i kraćim endoskopom, može dati dovoljno podataka na temelju kojih se može, i u terenskim uvjetima, razlikovati rekurentna opstrukcija od upalne bolesti donjih dišnih prohoda. Nepromjenjen izgled sluznice dušnika uz prisutnost male količine sluzi, u konja s kliničkom slikom kronične upale donjih dišnih puteva, govori u prilog upalne bolesti dišnih prohoda, dok endoskopski nalaz izrazito otečene sluznice dušnika s velikom količinom sluzi upućuje na dijagnozu rekurentne opstrukcije dišnih prohoda. Nalaz umjerene količine sluzi uz crvenilo sluznice dušnika govori u prilog infekcije u dubljim dijelovima pluća (Tablica 3). Značaj dobivenih rezultata, osobito onaj praktični, ne može se dovoljno naglasiti. Nedvojbeno, veterinar praktičar, već iz anamnestičkih podataka i prilikom općeg kliničkog pregleda može postaviti osnovanu sumnju na rekurentnu opstrukciju dišnih prohoda, a endoskopski pregled gotovo može biti dovoljan za potpuno razlikovanje upalne bolesti dišnih prohoda, rekurentne opstrukcije ili infekcije donjih dišnih prohoda.

Konačna nadopuna dijagnostičkih postupaka, kod kliničke slike kronične upale donjih dišnih prohoda, su citološka i mikrobiološka pretraga ispirka dušnika (TA) i/ili pluća (BAL). Brojna istraživanja su pokazala razlike u nalazu staničnog sastava ispirka dušnika i ispirka pluća. Sastav stanica u bronhoalveolarnom ispirku u direktnoj je korelaciji s prirodom upalnog procesa u donjim dišnim putevima. S druge strane, dijagnostički značaj broja i udjela pojedinih stanica u ispirku dušnika dugo je bio upitan zbog velikih razlika u broju i udjelu neutrofilnih granulocita u zdravih konja (DERKSEN i sur., 1985.). Kasnija istraživanja su ipak pokazala da se u ispirku dušnika u 90% trkaćih konja javlja udio neutrofilnih granulocita manji od 10%, a udio neutrofilnih granulocita veći od 20% govori u prilog oboljenja dišnog sustava (CHAPMAN i sur., 2000.; CHRISTLEY i sur., 2001.). Dijagnostička vrijednost ispirka dušnika je u pružanju informacija o upalnom procesu većeg područja pluća, dok se ispirak pluća odnosi samo na područje pojedinih reznjeva koji se ispiru (MALKIDIES i sur., 2003.).

Citološka pretraga u ovom istraživanju se temeljila isključivo na pretragama ispiraka dušnika, kako se čini jedinim dostupnim dijagnostičkim materijalom na području Republike Hrvatske. Dobiveni rezultati su potvrdili da se citološkom pretragom ispiraka dušnika konja s kroničnim oboljenjem dišnog sustava nalazi povećan udio neutrofilnih granulocita (veći od 20%) i u slučaju upalne bolesti i rekurentne opstrukcije i infekcije dišnih prohoda. Također, dobivenim rezultatima, ustanovljena je razlika u citološkom nalazu ispirka dušnika između konja s infekcijom i rekurentnom opstrukcijom te konja s upalnom bolesti dišnih prohoda,

gdje je u konja s upalnom bolesti dišnih prohoda zablježen najveći udio makrofaga. Navedeni rezultat dodaje još jednu vrijednost, uz povećani udio neutrofilnih granulocita, na temelju kojeg se citološkom pretragom ispirka dušnika neupitno može postaviti sumnja na upalnu bolest dišnih prohoda. S obzirom na ostale stanične tipove nije pronađena razlika u njihovim udjelima na temelju kojih bi se moglo razlikovati navedena oboljenja, kao što je to slučaj s citološkom pretragom bronhoalveolarnog ispirka (DERKSEN i sur., 1985.; COUËTIL i sur., 2001.; ROBINSON i sur., 2003.; HOFFMAN, 2008; RICHARD i sur., 2010.).

Posebna pažnja u etiologiji kroničnih bolesti donjih dišnih puteva kod konja u posljednjih nekoliko godina pridaje se virusima. Razlog ovome je da je u ljudi dokazana jasna povezanost virusnih infekcija, osobito rinovirusnih, s nastupom i egzacerbacijom simptoma astme (KHETSURIANI i sur., 2007.; HORSINGTON i sur., 2013.). ERV-A i ERV-B (engl. *Equine Rhinovirus –A i –B*) su vrlo česti patogeni dišnog sustava konja, s dokazanom visokom incidencijom infekcije s ERV-A, no točan utjecaj navedenog virusa na smanjenu radnu sposobnost konja još uvijek nije dokazan (BACK i sur., 2015.). Noviji podaci eksperimentalnih infekcija su pokazali da bi u etiologiji upalne bolesti i rekurentne opstrukcije donjih dišnih prohoda konja značajnu ulogu mogli imati i EHV-2 i EHV-5, virusi koji uzrokuju upalne promjene kroničnog tijeka i dovode do trajnih i neizlječivih promjena poput multinodularne plućne fibroze u slučaju infekcije s EHV-5 (FORTIER i sur., 2013.).

Prospektivni dio ovog istraživanja bila je uspostava metoda molekularne virusološke identifikacije najznačajnijih uzročnika infekcija dišnog sustava konja. Neočekivano nisu pronađeni pozitivni uzorci za prisutnost genoma EIV, EVA, ERV-A, ERV-B BPI-3 i adenovirusa koji su u drugim istraživanjima dokazivani relativno često (WOOD i sur., 2005.a). Premda su ispirci dušnika pretraženi na prisutnost genoma svih poznatih herpesvirusa konja dokazana je prisutnost genoma EHV-5. Negativnim nalazom virusološke pretrage u ispicima dušnika konja isključene su akutne virusne infekcije kao razlog pogoršanja kliničkih znakova upale donjih dišnih prohoda. U uzorku od 32 pretražena ispirka dušnika nije dokazana značajnost virusnih infekcija u razvoju upalne bolesti dišnih prohoda odnosno rekurentne opstrukcije dišnih prohoda. Kao poseban zaključak ističe se niska prevalencija EHV-5 u pretraženim uzorcima iako se smatra da je ovim virusom inficiran gornji dišni trakt 24 do 33% asimptomatskih konja (NORDENGRAHN i sur., 2002.). Ova činjenica govori u prilog da je sastav ispiraka dušnika reflektira upalno stanje koje nije povezano s cijedenjem nazalnog iscjetka.

Zaključno, dobiveni rezultati u ovom istraživanju po prvi put sistematiziraju dijagnostičke parametre potrebne za objektivno razlikovanje kroničnih upala donjeg dišnog sustava konja, pritom uzimajući u obzir sva ograničenja s kojima se doktori veterinarske medicine susreću u terenskom radu na području Republike Hrvatske. Također, ovim istraživanjem je prikazana i zahtjevnost točne dijagnostike kroničnih oboljenja dišnog sustava konja za koju je nužan multidisciplinarni pristup i uska suradnja specijalista iz različitih grana veterinarske medicine. Za potrebe ovog istraživanja uvedene su i validirane brojne dijagnostičke metode s ciljem uniformiranja dijagnostičkih protokola u Republici Hrvatskoj. Potrebna su opsežnija istraživanja u populaciji zdravih konja na području Republike Hrvatske, koja bi omogućila određivanje značajnih dijagnostičkih parametara citološke ili mikrobiološke pretrage. Ovo istraživanje nesumnjivo daje smjernice za buduća istraživanja kako na području Republike Hrvatske tako i na globalnoj razini.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Kronične upale u donjim dišnim prohodima konja predstavljaju značajan dijagnostički problem u konjogojstvu na području Republike Hrvatske.
2. Anamnestički podaci te podaci kiničkog pregleda i endoskopske pretrage neobično su važni u diferencijalnoj dijagnostici kroničnih upala donjih dišnih puteva u konja.
3. Ispirak dušnika je dijagnostički nezamjenjiv supstrat za postavljanje konačne dijagnoze poremećaja donjih dišnih puteva u konja.
4. Određivanje udjela makrofaga u ispirku dušnika pokazao se kao parametar koji može olakšati razlikovanje upalne bolesti donjih dišnih prohoda od ostalih upala u dubljim dijelovima pluća konja.
5. Multidisciplinarni pristup dijagnostici je jedini ispravni način da se dođe do konačne dijagnoze u kroničnih oboljenja dišnog sustava konja i osnova je za unaprijeđenje zdravlja konja na području Republike Hrvatske općenito.

## 8. POPIS LITERATURE

AINSWORTH, D. M., J. CHEETHAM (2010): Disorders of the Respiratory System. In: Equine internal medicine (Reed S. M., W. M. Bayly, D. C. Sellon, Eds.), Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 325-346.

BACK, H., J. PENELL, J. PRINGLE, M. ISAKSON, N. RONEUS, L. T. BERNDTSSON i sur. (2015): A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. *Vet. Rec. Open.* 2 (1): e000107.

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

CARDWELL, J. M., K. C. SMITH, J. L. N. WOOD, J. R. NEWTON (2014): Infectious risk factors and clinical indicators for tracheal mucus in British National Hunt racehorses. *Equine. Vet. J.* 46, 150– 155.

CHAPMAN, P. S., C. GREEN, J. P. M. MAIN i sur. (2000): Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet. Rec.* 146, 91-95.

CHRISTLEY, R. M., D. R. HODGSON, R. J. ROSE i sur. (2001): A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine. Vet. J.* 33, 256–264.

COUËTIL, L. L., A. M. HOFFMAN, J. HODGSON i sur. (2007): Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 356–361.

COUËTIL, L. L., F. S. ROSENTHAL, D. B. DENICOLA, C. D. CHILCOAT (2001): Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.* 62, 538–546.

COUËTIL, L. L., J. M. CARDWELL, V. GERBER, J. P. LAVOIE, R. LEGUILLETTE, E. A. RICHARD (2016): Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 503–515.

- COUËTIL, L. L., M. P. WARD (2003): Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990– 1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1645–1650.
- DERKSEN, F. J., J. S. SCOTT, D. C. MILLER, i sur. (1985): Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 1066–1070.
- DIXON, P. M., D. I. RAILTON, B. C. MC GORUM (1995): Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine. Vet. J.* 6, 422-427.
- DONALD, R. V., P. WARRENER, L. BENNETT, E. R. SCHULTZ, S. COULTER, R. L. GARBER, T. M. ROSE (1996): Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 7, 1666–1671.
- FORTIER, G. D., E. RICHARD, H. HUE, C. FORTIER, S. PRONOST, D. POTTIER i sur. (2013): Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses. *Vet J.* 197, 492–495.
- FUJITSUKA, A., H. TSUKAGOSHI, M. ARAKAWA, K. GOTO-SUGAI, A. RYO, Y. OKAYAMA i sur. (2011): A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC. Infect. Dis.* 11, 168.
- GERBER, V., A. LINDBERG, C. BERNEY, N. E. ROBINSON (2004): Airway mucus in recurrent airway obstruction–short-term response to environmental challenge. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 92–97.
- HOFFMAN, A. M. (2008): Bronchoalveolar lavage: Sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 24, 423-432.
- HORSINGTON, J., S. E. LYNCH, J. R. GILKERSON, M. J. STUDDERT, C. A. HARTLEY (2013): Equine picornaviruses: well known but poorly understood. *Vet. Microbiol.* 167, 78–85.
- IVESTER, K. M., COUËTIL L. L., G. E. MOORE i sur. (2014): Environmental exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 918–924.

JEFFCOTT, L. B., P. D. ROSSDALE, J. FREESTONE, C. J. FRANK, P. F. TOWERS-CLARKE (1982): An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine. Vet. J.* 14, 185-198.

JOHNSON, D. J., E. N. OSTLUND, T. J. PALMER, K. L. FETT, B. J. SCHMITT (2012): Isolation of Equine rhinitis A virus from a horse semen sample. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 801–803.

KHETSURIANI, N., N. N. KAZEROUNI, D. D. ERDMAN, X. LU, S. C. REDD, L. J. ANDERSON i sur. (2007): Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 119, 314–321.

MAIR, T. S., (1987): Value of tracheal aspirates in the diagnosis of chronic pulmonary diseases in the horse. *Equine. Vet. J.* 5, 463–465.

MALKIDIES, N., K. J. HUGES, D. R. HODGSON, J. L. HODGSON (2003): Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust. Vet. J.* 11, 685-687.

MILLERICK-MAY, M. L., W. KARMAUS, F. J. DERKSEN i sur. (2011): Particle mapping in stables at an American Thoroughbred racetrack. *Equine. Vet. J.* 43, 599–607.

NORDENGRAHN, A., M. MERZA, C. ROS i sur. (2002): Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using typespecific PCR assays. *Vet. Res.* 3, 251-259.

PIRIE, R.S., D. D. COLLIE, P. M. DIXON, B. C. MCGORUM (2002): Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. *Equine. Vet. J.* 34, 337-42.

RICHARD, E. A., G. D. FORTIER, P. M. LEKEUX, E. VAN ERCK (2010): Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *Vet. J.* 185, 115–122.

ROBINSON, N. E., C. BERNEY, S. EBERHART i sur. (2003): Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 64, 550–557.

- ROSENTHAL, F. S., A. GRUNTMAN, L. L. COUËTIL (2006): A comparison of total, respirable, and real-time airborne particulate sampling in horse barns. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 599–605.
- ROSSDALE, P. D., R. HOPES, N. J. W. DIGBY, K. OFFORD, N. J. WINGFIELD DIGBY (1985): Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet. Rec.* 116, 66-69.
- SPACKMAN, E., D. A. SENNE, T. J. MYERS, L. L. BULAGA, L. P. GARBER, M. L. PERDUE, K. LOHMAN, L. T. DAUM, D. L. SUAREZ (2002): Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 9, 3256–3260.
- STOKES, A., E. L. TIERNEY, B. R. MURPHY, S. L. HALL (1992): The complete nucleotide sequence of the JS strain of human parainfluenza virus type 3: comparison with the Wash/47885/57 prototype strain. *Virus Res.* 1-2, 91-103.
- STOREY, D. G., M. J. CÔTÉ, K. DIMOCK, C. Y. KANG (1987): Nucleotide Sequence of the Coding and Flanking Regions of the Human Parainfluenza Virus 3 Hemagglutinin – Neuraminidase Gene: Comparison with Other Paramyxoviruses. *Intervirology.* 27, 69–80.
- THOMSON, D., J. MEERS, B. HARRACH (2002): Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*), *Virus Res* 83, 189 – 195.
- VIEL, L. (1983): Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease, University of Guelph, Canada.
- WOOD, J. L. N., J. R. NEWTON, N. CHANTER, J. A. MUMFORD (2005a): Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses. *J. Clin. Microbiol.* 43, 120-126.
- WOOD, J. L. N., J. R. NEWTON, N. CHANTER, J. A. MUMFORD (2005b): Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine. Vet. J.* 37, 236–242.
- WOODS, P. S., N. E. ROBINSON, M. C. SWANSON i sur. (1993): Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine. Vet. J.* 25, 208–213.

YAMADA, S., T. MATSUMURA, K. TSUJIMURA, T. YAMAGUCHI, K. OHYA, H. FUKUSHI (2008): Comparison of the Growth Kinetics of Neuropathogenic and Nonneuropathogenic Equid Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Strains in Cultured Murine Neuronal Cells and the Relevance of the D/N752 Coding Change in DNA Polymerase Gene (ORF30). *J. Vet. Med. Sci.* 5, 505-11.

## 9. SAŽETAK

Bolesti dišnog sustava se pojavljuju u konja širom svijeta, iako rijetko smrtonosne, one su drugi najvažniji uzrok ekonomskih gubitaka u konjogojstvu jer dovode do smanjene radne sposobnosti natjecateljskih konja. Kronične bolesti dišnog sustava konja se prema etiologiji dijele na infektivna i neinfektivna oboljenja. U skupini kroničnih neinfektivnih upala donjih dišnih prohoda konja, najznačajnije mjesto zauzimaju dva sindroma: rekurentna opstrukcija dišnih prohoda (RAO) i upalna bolest dišnih prohoda (IAD), čije razlikovanje predstavlja veliki klinički izazov.

Cilj ovog rada je uspostava cjelovitog dijagnostičkog pristupa kroničnim upalama u donjim dijelovima dišnog sustava konja na području Republike Hrvatske. Tijekom ovog istraživanja prikupljeni su anamnestički te podaci kliničkog pregleda od 32 konja. Od istih životinja prikupljeni su uzorci ispirka dušnika koji su pretraženi citološki i virusološki. Statističkom obradom određen je značaj te međusobna povezanost pojedinih parametara općeg kliničkog pregleda s endoskopskim, citološkim i virusološkim nalazom ispirka dušnika.

Rezultati istraživanja su pokazali da rekurentna opstrukcija dišnih prohoda, upalna bolest dišnih prohoda i infekcija u dubljim dijelovima pluća predstavljaju značajan dijagnostički problem na području Republike Hrvatske. Pokazano je i da anamnestički podaci, podaci kliničke i endoskopske pretrage, prošireni citološkom i virusološkom analizom, daju nezamjenjive podatke koji omogućavaju postavljanje točne dijagnoze koja je nužna za ispravan način liječenja te oporavak oboljele životinje. Istraživanje je pokazalo neophodnost uspostave i provedbe multidisciplinarnog pristupa u dijagnostici kroničnih upala donjih dišnih puteva u konja.

**KLJUČNE RIJEČI:** *kronične respiratorne upale, IAD, RAO, dijagnostika*

## 10. SUMMARY

### DETERMINATION OF ETIOLOGY AND CHARACTERISTICS OF CYTOLOGICAL FINDINGS IN HORSES WITH CHRONIC AIRWAY DISEASES

Respiratory diseases are common among horses worldwide, and although rarely fatal, they are the second most important source of economic losses in the equestrian industry leading to poor performance of competition horses. Chronic respiratory diseases are etiologically classified as infectious and non-infectious diseases. In the group of equine chronic non-infectious airway diseases, two most important syndromes are Recurrent Airway Obstruction (RAO) and Inflammatory Airway Disease (IAD), and differentiating the two presents a major clinical challenge.

The aim of this research is to establish a complete diagnostic approach to equine chronic airway diseases in the Republic of Croatia. During this study, anamnestic and clinical data from 32 horses were collected. Equine tracheal aspirates samples, originating from those animals, were examined cytologically and virologically. The significance and interdependence of certain parameters of the general clinical examination, endoscopy and cytological and virological findings have been determined by means of statistical analysis.

The research results have shown that Recurrent Airway Obstruction, Inflammatory Airway Disease and lung infections are a significant diagnostic problem in the Republic of Croatia. Detailed anamnesis, clinical exam and endoscopic examination extended with cytological and virological analysis have provided irreplaceable data for making an accurate diagnosis necessary for the proper treatment and recovery of the diseased animal. This research has demonstrated the necessity of establishing and implementing a multidisciplinary approach of diagnosis of chronic airway diseases in horses.

**KEY WORDS:** *chronic respiratory inflammation, IAD, RAO, diagnostics*



## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16. srpnja 1993. godine u Zagrebu gdje sam završila "OŠ Josipa Jurja Strossmayera". Obrazovanje sam nastavila u V. Gimnaziji u Zagrebu, od 2008. do 2012.godine.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2012. godine, gdje sam u periodu od 2016. do 2018. godine volontirala na odjelu za konje Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju te Klinike za unutarnje bolesti. Obaveznu stručnu praksu odrađivala sam na klinici za konje veterinarskog fakulteta «*ONIRIS - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique*» smještenog u Francuskoj.