

Prirodne infekcije pitomih vretica - kućnih ljubimaca tijekom sezone influence u ljudi

Husta, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:178:073175>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Lidija Husta

**PRIRODNE INFEKCIJE PITOMIH
VRETICA – KUĆNIH LJUBIMACA
TIJEKOM SEZONE INFLUENCE U
LJUDI**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik Zavoda: Prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: Prof. dr. sc. Ljubo Barbić

Doc. dr. sc. Iva Šmit

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

Zahvala:

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojim mentorima Prof. dr. sc. Ljubo Barbić i Doc. dr. sc. Iva Šmit koji su mi omogućili svu potrebnu opremu i pomogli svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada, i što su uvijek imali strpljenja i vremena za moje upite.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji koja me je uvijek podržavala i upućivala na pravi put.

I na kraju, najveću zahvalnost za ono što sam postigla, pripisujem svojim roditeljima, koji su bili uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

Veliko hvala svima!

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Povijesni podaci.....	2
2.2. Etiologija	3
2.3. Epizootiologija	4
2.4. Geografska proširenost	4
2.5. Patogeneza, klinička slika i diferencijalna dijagnoza	5
2.6. Dijagnoza	6
2.7. Terapija	6
2.8. Preventiva	7
3. MATERIJAL I METODE	9
3.1. Uzorci pretraživanih seruma.....	9
3.2. Serološka dijagnostika.....	9
3.3. ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multispecies test.....	10
3.3.1. Izvođenje pretrage	12
3.3.2. Validacija testa.....	14
3.3.3. Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih uzoraka seruma	15
3.4. Ingezim influenza A test	16
3.4.1. Izvođenje pretrage	17
3.4.2. Validacija testa.....	18
3.4.3. Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih seruma	18
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČCI.....	27
7. LITERATURA	28
8. SAŽETAK	32
9. SUMMARY	34
10. ŽIVOTOPIS.....	36

1. UVOD

Influenca je jedna od najznačajnijih virusnih zoonoza, te zbog izmjene virusa kao i povremenog prelaska međuvrsne barijere predstavlja kontinuirani znanstveni izazov. Pitome vretice služe kao čest model za istraživanje influence, a prirodne infekcije pitomih vretica u kućanstvima istraživane su samo kod pojave kliničkih znakova koji upućuju na influencu, ali ne i kao prisutnost bolesti u populaciji. Cilj ovog diplomskog rada je odrediti mogućnost infekcije kućno držanih pitomih vretica virusom influence, određivanjem titra protutijela u serumu.

Influenca je akutna, virusna, kontagiozna respiratorna bolest uzrokovana virusom influence, porodice Orthomyxoviridae. Za pitome vretice je patogen virus humane influence tip A i tip B, a također su prijemljive na ptičji, konjski i svinjski influenza virus A. Infekcija virusom tipa B rjeđe uzrokuje bolest ili se pojavljuje samo s blažim kliničkim znacima (LANGLOIS, 2005.). Istraživanja o influenci pitomih vretica započela su 1933. god kada je prvi puta uspješno prenesen virus s čovjeka na neku životinjsku vrstu - pitome vretice (SMITH i sur., 1933.), te je dokazana mogućnost prijenosa infekcije s pitomih vretica natrag na čovjeka (SMITH i sur., 1936.), nakon toga intenzivnije se istraživalo o prijenosu infekcije između pitomih vretica (ANDREWES i sur., 1941.). Prirodne infekcije virusom influence pitomih vretica iako opisane još 1944. godine (FISCHER i SCOTT 1944.) nisu bile znanstveno područje s velikim brojem istraživanja. Objavljeno je tek nekoliko radova za vrijeme trajanja pandemije tzv. svinjske gripe u nekoliko znanstvenih radova (PATTERSON i sur. 2009., SWENSON i sur. 2010., HUI-TING i sur. 2014., CAMPAGNOLO i sur. 2012.).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Povijesni podaci

Epidemija influence u ljudi 1933. godine značajno je doprionijela eksperimentalnom istraživanju te bolesti. Pitome vretice prva su životinjska vrsta na koju je virus uspješno prenesen intranazalnom i supkutanom aplikacijom ispirka ždrijela oboljelih osoba (SMITH i sur., 1933). U ovom istraživanju, inicijalno su zaražene dvije pitome vretice, koje su direktnim kontaktom zarazile druge pitome vretice. Tako je dobiven izolat virusa koji je pasažom prenesen kroz 196 pitomih vretica. Nekoliko godina kasnije pokušano je prenijeti "bolest sličnu influenci" na pitome vretice, ali niti jedna pitoma vretica nije pokazala znakove bolesti, zatim su te iste pitome vretice zaražene izolatom iz prethodnog istraživanja i sve su pokazivale kliničke znakove influence. Jedan od znanstvenika koji je sudjelovao u ovom istraživanju slučajno se zarazio virusom influence od zaražene pitome vretice i time je dokazao da se virus može ponovno prenijeti s pitomih vretica na čovjeka (SMITH i sur., 1936.).

Razvoj suvremenih koncepata imuniteta virusa influence bio bi nemoguć bez upotrebe pitomih vretica u istraživanjima. One su dobar model za proučavanje influence iz nekoliko razloga: infekcija influence u pitomih vretica blisko nalikuje onoj u ljudi u odnosu na kliničke znakove, patogenezu i imunitet, a tip A i B humanog influenza virusa prirodno je zarazan za pitome vretice (MAHER, 2004.). Tako se na njima istražuju načini širenja virusa između pitomih vretica (ANDREWES i sur., 1941.), patogeneza bolesti (MUNSTER i sur., 2009.), te se koriste za proizvodnju i istraživanje novih cijepiva i antivirusnih lijekova kao i antiseruma za antigensku tipizaciju uzročnika. U 40-im godinama prošlog stoljeća opisana su dva slučaja epizootije virusa influence A u izoliranim kolonijama pitomih vretica, koje je vjerojatno zarazio čovjek koji je rukovao s njima (FISHER I SCOTT, 1944., BELL i DUDGEON, 1948.). Nakon ovih istraživanja, pitome vretice koriste se samo kao modeli sve do 2009. godine kada je vladala pandemija influence A, tzv. svinjske gripe (H1N1) i tada su opisani slučajevi prirodnih infekcija na raznim stranama svijeta (PATTERSON i sur., 2009; SWENSON i sur., 2009; CAMPAGNOLO i sur. 2012; HUI-TING i sur. 2014.).

2.2. Etiologija

Virusi influence su kuglasti, obavijeni, jednolančani RNA virusi iz porodice Orthomyxoviridae. Dulje vrijeme su poznata tri tipa virusa: Influenca virus A, Influenca virus B i Influenca virus C, a posljednjih godina je opisan i Influenca virus D u nekoliko životinjskih vrsta (ASHA i KUMAR, 2019.). Virus se sastoji iz vanjskog lipoproteinskog omotača i unutarnje ribonukleoproteinske jezgre, koja sadrži virusni RNA genom, i ostale proteine. Virus influence tip A, koji je prototip virusa Orthomyxoviridae, sadrži 10 gena na 8 RNA segmenata, po jedan ili dva gena na svakom od ovih lanaca. Ovojnica virusa sadrži dva vrlo važna površinska glikoproteina, hemaglutinin (HA) i neuraminidazu (NA). Unutar lipoproteinske ovojnice je ljuska koja sadrži M protein, on se povezuje s nukleoproteinima i drugim proteinima koji imaju ulogu u replikaciji i transkripciji. Glikoproteinski hemaglutinin (HA) je odgovoran za vezanje na stanicu prije penetracije i fuzije, on također ima i tendenciju da se podvrgne antigenskim promjenama, najčešće zbog antigenskog skretanja, tj. točkastih mutacija koje nastaju s vremenom. Promjene u genomu također mogu biti i posljedica antigenske izmjene, odnosno genetskog preslagivanja između humanog influenza A virusa i različitih sojeva influenza A virusa koji mogu biti primarni virusi različitih vrsta. Ove genomske promjene rezultiraju fenotipskim promjenama koje pridonose poteškoćama u razvoju liječenja te prije svega cjepiva za ovu bolest. Za otpuštanje novih umnoženih čestica virusa iz stanice zaslužan je glikoprotein neuraminidaza (NA) (MAHER i sur., 2004.). Influenca A virusi su na temelju površinskih glikoproteina klasificirani u 16 hemaglutininskih podtipova (H1-H16) i 9 neuraminidaznih podtipova (N1-N9). Svi su oni zabilježeni u ptica, a samo neki od njih i u sisavaca. Većina tipova u peradi izaziva asimptomatsku infekciju, ili blagu bolest i virus se može pojaviti u bilo kojoj kombinaciji navedenih 16 HA i 9 NA podtipova. Kombinacije sa H5 i H7 podtipovima su izrazito patogene i izazivaju masovna uginuća u intravenski inokuliranih pilića te su najčešće svrstani u visokopatogene viruse influence. Endemske/enzootske influence u sisavaca opisane su u svinja i ljudi (najčešće tipovi H1N1, H3N2), konja i pasa (najčešće H3N8), te rijetke pojave različitih ptičjih podtipova na sisavcima, a opisane su povremeno i infekcije sisavaca različitim podtipovima virusa influence ptica (MADIĆ i sur., 2018.)

2.3. Epizootiologija

Izvor infekcije su bolesne životinje i inkubacijske kliconoše, koji izlučuju virus u velikim količinama u nosnom iscjetku, kašljanjem i kihanjem. Inkubacijski kliconoše izlučuju virus 24 sata prije pojave kliničkih znakova, pa tako predstavljaju značajan izvor infekcije. Kontaminirani predmeti i prostori u kojima borave bolesne životinje i kliconoše, također mogu biti izvori infekcije. Bolest se širi izravnim dodirima sa bolesnim životinjama ili kliconošama, ali i u velikoj mjeri zrakom kao kapljične infekcije, odnosno nastankom aerosola virusnih čestica koje ostaju u prašini, te kontaminiranim predmetima. Pitome vretice prirodno su prijemljive na humane viruse influence, pa se tako bolest prenosi između pitomih vretica kao i sa pitomih vretica na čovjeka te sa čovjeka na pitome vretice (antropozoonotska/zoonotska bolest). Rizik prijenosa je najveći kada je pireksija na vrhuncu (vrućica). Prijenos virusa H1N1 između pitomih vretica ovisi o prisutnosti specifičnih genskih segmenata; HA za izravan prijenos kontaktom, PB2 za prijenos kapljičnom infekcijom, NP i 3 genom kompleks za visoku učinkovitost replikacije u respiratornom traktu. Epizootije influence opisane su u pitomih vretica za vrijeme lokalnih izbijanja influence u ljudi, kao i za vrijeme velike pandemije influence A (H1N1) 2009. godine (PATTERSON i sur., 2009.; SWENSON i sur., 2009.; CAMPAGNOLO i sur. 2012.; HUI-TING i sur. 2014.).

2.4. Geografska proširenost

Humana influenza je poznata po cijelome svijetu već gotovo čitavo stoljeće, a vrlo vjerojatno je prisutna i u pitomih vretica iako dugi niz godina nije bila predmet istraživanja. Prva prirodna infekcija u pitomih vretica je zabilježena u Torontu, Kanadi 1944. god, zatim 1948. god u pokrajini Sussex, u Velikoj Britaniji.

2009. i 2010. godine za vrijeme trajanja humane pandemije influence A, H1N1, zabilježeno je nekoliko izbijanja influence uzrokovane istim uzorkom u pitomih vretica po različitim dijelovima SAD-a i po ostatku svijeta. Pa je tako 2009. zaražena kolonija pitomih vretica u Iowi, zatim nekoliko tvorova u Oregonu i Nebraski; 2010. grupa pitomih vretica iz Pennsylvanije koja potiče iz iste trgovine za kućne ljubimce. Nakon

širenja po SAD-u isti pandemijski soj (A(H1N1)pdm09) je 2013. god dokazan i na Tajvanu.

2.5. Patogeneza, klinička slika i diferencijalna dijagnoza

Nakon intranazalne inokulacije, virus se lokalizira i replicira u velikom broju unutar nazalne sluznice. Veže se za sialinsku kiselinu α -2,6 ili α -2,3 receptora za viruse gripe na površinskom respiratornom epitelu. Sposobnost određenih sojeva da inficiraju stanice donjeg respiratornog trakta ili drugih organskih sustava odnosi se prvenstveno na svojstva hemaglutininskog glikoproteina. Za aktivaciju virusne infektivnosti, potrebno je cijepanje prekursora hemaglutinina, a distribucija aktivirajućih proteaza u domaćinu je glavni faktor tkivnog tropizma. Za razliku od slabo ili nepatogenih sojeva, gdje dolazi do ekstracelularnog cijepanja hemaglutinina, hemaglutinini visoko patogenih sojeva cijepaju se intracelularno sveprisutnim proteazama koje im omogućuju infekciju širokog raspona stanica.

Klinički znakovi infekcije influencom ovise o dobi zaražene pitome vretice, soju virusa, uvjetima okoline, stupnju sekundarnih bakterijskih infekcija, i ostalim faktorima. Morbiditet je obično visok, a mortalitet je viši u mlađih i imunokompromitiranih jedinki. Virusi humane influence uzrokuju ozbiljniju bolest od ptičjih virusa, a smrtnost može biti visoka nakon infekcije visoko patogenim sojevima humane influence. Ako nema komplikacija simptomi obično traju 3-5 dana. Kliničkim pregledom može se ustanoviti groznica i znakovi blage infekcije gornjih dišnih puteva, poput brzog početka kihanja, seroznog iscjetka iz oka i nosa, blage inapetencije do potpune anoreksije, a mogu se uočiti i letargija, dispneja, konjuktivitis, fotofobija, otitis, dermatitis oko očiju i nosa, te neuralni znakovi. Bolest se u težim slučajevima može razviti u bronhitis ili upalu pluća. Neurološki simptomi, poput ataksije, pareze stražnjih ekstremiteta i tortikolisa, zabilježeni su u pitomih vretica koje su eksperimentalno inokulirane virusima visokopatogene ptičje influence A (H5N1).

Diferencijalna dijagnoza kod svake pitome vretice koja ima simptome gornjeg respiratornog trakta, treba uključivati i štenećak. Obično blag i kratak tijek bolesti kod infekcije influencom pomaže u razlikovanju od štenećaka.

2.6. Dijagnoza

Osnovna metoda dijagnostike influence je pravilno uzeta anamneza, poznavanje epizootiološke situacije te detaljan klinički pregled životinje sumnjive na oboljenje. Sumnja na bolest se postavlja na temelju anamnestičkih podataka i kliničke slike te patoanatomskog nalaza, a objektivna dijagnoza bolesti se postavlja izdvajanjem i dokazom uzročnika i/ili specifičnih serumskih protutijela laboratorijskim metodama. Komercijalno su dostupni serološki testovi poput imunoenzimnog testa (ELISA-e). U laboratorijskoj dijagnostici još se koriste test inhibicije hemaglutinacije i test mikroneutralizacije. Navedene metode dijagnostike rijetko se koriste u kliničkoj praksi, a češće u istraživanjima zato što proizvodnja antitijela počinje 6-7 dan nakon infekcije, a do tada simptomi uglavnom nestanu. Izdvajanje virusa i RT-PCR u stvarnom vremenu mogu se izvoditi na uzorcima svježih ili smrznutih tkiva, briseva nosa ili bronhoalveolarnih ispirka. Također se identificirani virusi influence A mogu klasificirati određivanjem podtipova hemaglutinina i neuraminidaze. Postmortem dijagnoza postavlja se histopatološki i imunohistokemijski na uzorcima tkiva fiksiranim formalinom.

2.7. Terapija

Općenito, bolest je blaga, a liječenje se uglavnom sastoji od potporne terapije i primjene antibiotika, te simptomatske terapije poput lijekova za supresiju kašlja. Brojna eksperimentalna istraživanja pokazala su da antivirusna terapija može prevenirati bolesti, smanjiti kliničke znakove i unutarnje lezije koje uzrokuje virus. Antivirusni lijekovi koji su se pokazali sigurnim i djelotvornim u pitomih vretica su inhibitor neuraminidaze oseltamivir (Tamiflu®) 2,5-5 mg/kg BID kroz 10 dana, odnosno veće doze (12,5 mg/kg BID) za liječenje kliničkih slučajeva, te inhibitor neuraminidaze zanimivir (Relanza®) koji se daje inhalacijom 0,3-1 mg/kg BID. Interferon α (humani) smanjuje izraženost kliničkih znakova u pitomih vretica ako se koristi u dozi 107 jedinica SID tijekom nekoliko dana, a može se davati intranazalno ili injekcijom. Intranazalni put nije toliko učinkovit za visokopatogene sojeve jer ovako pripremljen lijek ne može doći do pluća. Također su istraživani i drugi antivirusni lijekovi (inhibitori

ionskog kanala M2 – amantadin i rimantadin), kojima se postiže bolja otpornost na infekcije influenza A virusima, ali nisu toliko učinkoviti protiv virusa influence B i mogu imati štetne učinke na CNS. Većina ovih lijekova mogu se koristiti i za preventivu i za liječenje, a gube djelotvornost nakon što pitoma vretica počne pokazivati kliničke znakove. Također doze za preventivu bolesti niže su od onih za liječenje. Novi lijekovi za liječenje ljudske gripe stalno se razvijaju, a većina njih testira se na pokusnim pitomim vreticama, stoga bi u bliskoj budućnosti trebali biti dostupni novi lijekovi za sigurno i učinkovito liječenje pitomih vretica, ali i ljudi.

2.8. Preventiva

S obzirom na to da je ovo zoonotska i antropozoonotska bolest, posebnu pažnju u preventivi treba obratiti na sprječavanje širenja bolesti na druge životinje ili ljude. Najveći rizik prijenosa bolesti s pitomih vretica je u prvih 3-5 dana bolesti, odnosno za vrijeme pireksije, iako je prijenos virusa moguć i prije pojave simptoma. Kao i kod drugih virusnih bolesti, okolinu treba temeljito očistiti i ukloniti sve organske tvari, pa potom dezinficirati, da uzročnik dođe u izravan kontakt sa dezinficijansom. Također i različita fizikalna djelovanja, poput ultraljubičastih zraka, topline i sušenja pomažu smanjiti broj čestica virusa influence u okolišu, pa će tako vrući i suhi sunčani dani uzrokovati brzu prirodnu inaktivaciju virusa. Suha toplina može se koristiti za inaktiviranje virusa u kombinaciji 32°C kroz 3 sata, ili 38°C kroz 30 minuta. Pranje sapunom i toplom vodom također se može koristiti za uklanjanje organske tvari i inaktivaciju virusa. Mnogi kemijski dezinficijensi mogu inaktivirati virus ptičje gripe uključujući jodofore, vodikov peroksid, etanol (70%), izbjeljivač (2-3% natrijev hipoklorit kroz 10-30 minuta kontakta), fenoli, krezoli, glutaraldehid, formaldehid i formalin, kiseline (klorovodična i limunska), te natrijev hidroksid (kaustična soda). Fenoli, krezoli, jodofori i glutaraldehidi djelotvorni su u prisutnosti organske tvari, dok su kvaterni amonijevi spojevi, natrijev hipoklorit i etanol manje učinkoviti u prisutnosti organske tvari. Preporučuje se što više koristiti kemikalije koje nisu toksične za ljude, a toksičnije kemikalije ostaviti za situacije kada se ostale ne mogu primijeniti.

Kontrola širenja influence bazira se na izbjegavanju kontakta između prijemljivih i inficiranih jedinki, bilo pitomih vretica ili ljudi. Teoretski se bolest može prenijeti i ako pitome vretice dolaze u kontakt sa životinjama iz drugog kućanstva.

Cijepljenje pitomih vretica za sada nije preporučljivo zbog antigenskih varijacija i relativno blagog tijeka bolesti, ali smatra se da su dobro zaštićeni ako su držani u kući i njihovi vlasnici su cijepljeni. Nakon preboljenja influence, eksperimentalne infekcije pokazale su da su pitome vretice zaštićene od nove infekcije istim sojem virusa kroz 5 tjedana nakon inicijalne infekcije. Također se antitijela nakon preboljenja prenose mlijekom na mladunčad na sisi.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorci pretraživanih seruma

U istraživanju je ukupno pretraženo 39 uzoraka seruma pitomih vretica. Serumi su odvojeni centrifugiranjem krvi pri 2000 okretaja/minuti tijekom 10 minuta prilikom pripreme uzoraka za biokemijske laboratorijske pretrage provedene u Centralnom laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti te pohranjeni pri -20°C do izvođenja serološke pretrage.

Uzorci seruma prikupljeni su iz Centralnog laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od veljače 2017. godine do travnja 2018. godine. Navedeno razdoblje prikupljanja uzoraka određeno je kako bi se uzorci prikupljali u sezoni pojave infekcija virusom influence u ljudi u Republici Hrvatskoj. Kako bi još više naglasili poveznicu s javnim zdravstvom, uzorci su prikupljeni iz ostalih uzoraka seruma podrijetlom od životinja koje borave u kućanstvima, u bliskom suživotu s ljudima.

Za pitome vretice bilježeni su podaci o dobi, spolu, razloga dolaska na kliniku, o prisutnosti respiratornih simptoma u pitomih vretica ili vlasnika te drugih životinja iz kućanstva, te s kojim životinjama dolaze u kontakt kao i kliničkoj slici pri zaprimanju na obradu na Klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Serološka dijagnostika

U svrhu dokaza specifičnih serumskih protutijela za virus influence tip A u pretraživanim uzorcima seruma korištena su dva komercijalna kompleta za izvođenje imunoenzimskog testa (ELISA), ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species (ID.vet, Grabels, Francuska) i Ingezim Influenza A (Imunologia y Genetica Aplicada, SA, Madrid, Španjolska). Komparativno smo izvodili dva testa da bi dobili pouzdanije rezultate i istražili mogućnost primjene u pitomih vretica, s obzirom na to

da su oba testa predviđena za ptice, svinje i konje, ali nije opisano da su se koristili i kod pitomih vretica.

Princip ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species testa je da se tijekom proizvodnje u sve jažice mikrotitracijske plitice veže nukleoprotein (NP) virusa influence A. Dodavanjem ispitujućeg seruma, ako su prisutna specifična protutijela ona se vežu na NP, a ako ih nema NP ostaje slobodan na stijenki jažice. U drugoj fazi, nakon ispiranja, dodaju se anti-nukleoproteinska protutijela označena peroksidazom (anti-NP). Ako ranije nisu vezana serumska protutijela dodana anti-NP se vežu za NP i u sljedećoj fazi postupka peroksidaza, kojom su označena, razgrađuje supstrat. U slučaju kada su na NP u jažicama u prethodnoj reakciji vezana protutijela iz pretraživanog seruma, anti-NP se ne mogu vezati i ispiru se te posljedično nema razgradnje supstrata u završnoj fazi izvođenja pretrage.

Ingezim Influenza A test temelji se također na tehnici blokirajućerg imunoenzimskog testa. Jažice mikrotitracijskih plitica obložene su antigenom te nakon dodavanja uzorka u jažicu, ako sadrži specifična antitijela protiv virusa ona će se vezati za antigen, odnosno ako uzorak ne sadrži specifična antitijela, antigen će ostati slobodan. Nakon ispiranja dodaje se konjugat, odnosno specifična protutijela konjugirana s peroksidazom, koja se vežu na slobodni antigen. Tako vezana konjugirana protutijela u završnoj fazi razgrađuju supstrat čime reakcija postaje vidljiva ili izostaje u slučaju pozitivnih pretraživanih uzoraka.

3.3. ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multispecies test

Za serološko pretraživanje seruma pitomih vretica u istraživanju je korišten komercijalni komplet za izvođenje imunoenzimskog testa (ELISA) „ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species“ (ID.vet, Grabels, Francuska), a izvedba cjelokupnog postupka načinjena je sukladno uputama proizvođača uz modifikaciju u pripremi seruma za pretraživanje. Korišteni dijagnostički komplet namijenjen je za otkrivanje specifičnih serumskih protutijela za NP virusa influence A u uzorcima seruma podrijetlom od različitih vrsta životinja. Međutim, u uputama proizvođača navodi se postupak pripreme seruma za pretraživanje podrijetlom od konja, svinja i više vrsta ptica, ali ne i pitomih vretica. Stoga se modifikacija postupka

očitovala u tome da su serumi pretraživanih životinja u pripremi za pretraživanje razrijeđeni puferском otopinom za razrjeđivanje seruma, koja je sastavni dio kompleta, u omjeru 1:10. Navedeni omjer razrjeđenja ispitivanih seruma koristio se i za istraživanje kod pasa istim ELISA testom (PRATELLI i COLAO, 2014).

U izvedbi dijagnostičke metode korišten je navedeni dijagnostički komplet koji sadržava:

1. Mikrotitracijske plitice s 96 jažica u koje je tijekom proizvodnje vezan antigen (nukleokapsidni protein virusa influence tip A)
2. Koncentrirani konjugat (10x)
3. Pozitivni kontrolni serum
4. Negativni kontrolni serum
5. Puferска otopina 2 (otopina za razrjeđivanje seruma)
6. Puferска otopina 3 (otopina za razrjeđivanje konjugata)
6. Koncentrirana otopinu za ispiranje (20X)
7. Otopina supstrata (TMB)
8. Otopina za zaustavljanje reakcije (0,5 M)

Osim navedenoga za izvedbu pretrage korišten je sljedeći pribor i oprema:

1. Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 10-100 μ l (Eppendorf)
2. Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 2-20 μ l (Eppendorf)
3. Višekanalna automatska mikropipeta zapremine 10-100 μ l (Eppendorf)
4. Čitač mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska)
5. Ispirač mikrotitracijskih plitica (Hydroflex, Tecan, Männedorf, Švicarska)
6. Tresilica
7. Termostat (BIOLAB 190, Angelantoni industrie, Massa Martana, Italija)
8. Erlenmayerova tikvica zapremine 300 ml
9. Lateks rukavice
10. Nastavci za pipete

Uz navedeno za pripremu radne otopine za ispiranje od koncentrirane otopine za ispiranje koja je dio dijagnostičkog kompleta korištena je i destilirana voda.

3.3.1. Izvođenje pretrage

Prije korištenja sve komponente komercijalnog ELISA kompleta te pretraživani serum i temperiraju se na sobnu temperaturu ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Svi reagensi se prije uporabe homogeniziraju na tresilici.

U prvom koraku, u svaku jažicu mikrotitracijske plitice dodaje se automatskom jednokanalnom pipetom po 90 μl puferne otopine 2 (otopina za razrjeđivanje seruma). Nakon toga se dodaje u po dvije jažice pozitivni, odnosno negativni kontrolni serum te u po dvije jažice svaki pretraživani serum, i na kraju ponovno dvije jažice pozitivni i dvije jažice negativni kontrolni serum. Na ovaj način se u svakoj jažici nalazi serum razrijeđen s puferom 2 u omjeru 1:10. Pozitivni i negativni kontrolni serum pretraženi su dvostruko na početku, i dvostruko na kraju mikrotitracijske plitice, radi veće pouzdanosti izvedene metode. Također je i svaki serum pretražen dvostruko, s obzirom na mali broj uzoraka (39).

Mikrotitracijska plitica s dodanim razrijeđenim serumima inkubira se tijekom 60 minuta (± 6 minuta) pri 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) u termostatu.

Nakon inkubacije se isprazni sadržaj jažica i plitica se ispiru pomoću ispirača mikrotitracijskih plitica 5 puta s po 300 μl radne otopine za ispiranje (Slika 1). Radna otopina za ispiranje prethodno se načini razrjeđivanjem koncentrirane otopine za ispiranje, koja je dio komercijalnog kompleta, s destiliranom vodom u Erlenmayerovoj tikvici u omjer 1:20. Istovremeno se načini radna otopina konjugata tako da se koncentrirani konjugat, koji je dio dijagnostičkog kompleta, razrijedi s puferom 3, koja je također dio ELISA kompleta, u omjeru 1:10.

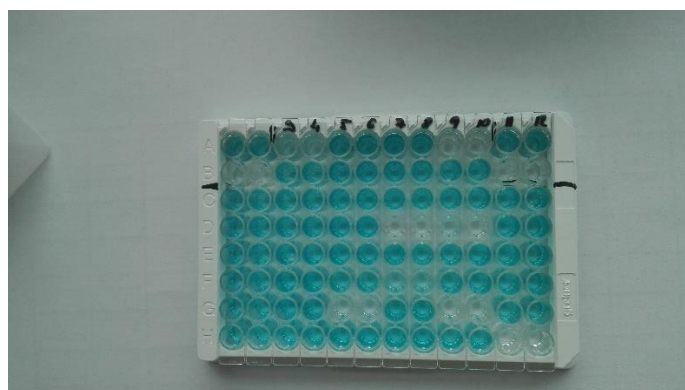
U svaku jažicu isprane mikrotitracijske plitice doda se multikanalnom automatskom pipetom po 50 μl radne otopine konjugata te se plitica inkubira pri sobnoj temperaturi ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) tijekom sljedećih 30 minuta (± 3 minute).

Nakon inkubacije ponovno se isprazne jažice mikrotitracijske plitice i isperu 3 puta s po 300 μl radne otopine za ispiranje pomoću automatskog ispirača mikrotitracijskih plitica.



Slika 1. Ispiranje jažica mikrotitracijske plitice u automatskom uređaju za ispiranje mikrotitracijskih plitica.

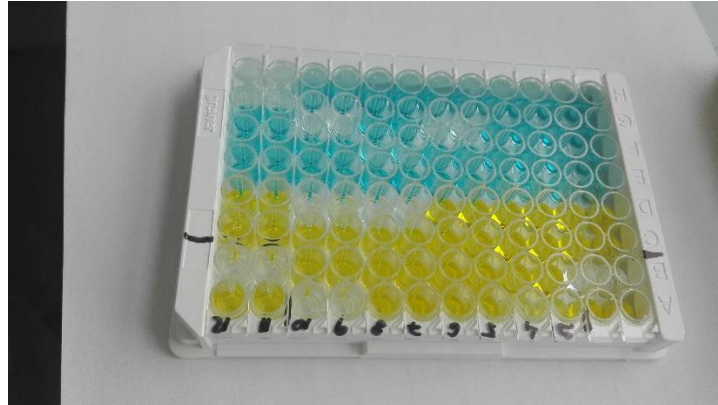
U sljedećoj fazi se u svaku jažicu dodaje po 50 μ l otopine supstrata te se plitica inkubira pri sobnoj temperaturi ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) tijekom 10 minuta (± 1 minuta) na mjestu nedostupnom svjetlosti (slika 2.)



Slika 2. Mikrotitracijska plitica nakon inkubacije, a prije dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije, vidljiva je razlika boje između pozitivnih i negativnih uzoraka

Iza navedene inkubacije dodaje se u svaku jažicu mikrotitracijske plitice po 50 μ l otopine za zaustavljanje reakcije razgradnje supstrata peroksidazom (slika 3). Ovisno o prisutnosti ili odsutnosti protutijela u pretraživanim uzorcima seruma vidljivo je žuto obojenje različitog intenziteta ili sadržaj jažice ostaje bezbojan.

Rezultati načinjenih pretraga se očitavaju pomoću čitača mikrotitracijskih plitica pri valnoj duljini od 450 nm.



Slika 3. Mikrotitracijska plitica za vrijeme dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije

3.3.2. Validacija testa

Sukladno uputama proizvođača, radi pouzdanosti i vjerodostojnosti postignutih rezultata svakog pojedinog pretraživanja, propisane su vrijednosti aritmetičke sredine očitavanja apsorbancije negativnog kontrolnog seruma te omjer srednje vrijednosti očitavanja kontrolnog pozitivnog i kontrolnog negativnog seruma koji jamči pouzdanost rezultata na pojedinoj mikrotitracijskoj plitici.

Izvođenje testa smatra se valjanim i postignuti rezultati vjerodostojnim ako je:

Srednja vrijednost očitanih rezultata za negativni kontrolni serum veća od 0,7:

$$OD_{NC} > 0.700$$

Omjer srednje vrijednosti očitnog rezultata za pozitivni kontrolni serum i srednje vrijednosti rezultata za negativni kontrolni serum za ispravno izvedenu pretragu mora biti manja od 0,3:

$$OD_{PC} / OD_{NC} < 0.3$$

3.3.3. Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih uzoraka seruma

Nakon načinjene pretrage očitane su vrijednosti rezultata za svaki pojedini pretraživani serum pomoću čitača mikrotitracijskih plitica na valnoj duljini od 450 nm.

Radi interpretacije rezultata izračunava se omjer očitane srednje vrijednosti apsorbancije pojedinog pretraživanog seruma i srednje vrijednosti očitanih rezultata negativnog kontrolnog seruma te se dobiveni broj množi sa 100 kako bi bio izražen u postotcima.

Na ovaj način za svaki pretraživani serum izračunat je kompeticijski postotak u odnosu na negativni kontrolni serum prema sljedećoj formuli:

$$S/N \% = OD_{uzorka} / OD_{NC} \times 100$$

Sukladno vrijednosti kompeticijskog postotka rezultat pretrage pojedinog seruma može biti:

- pozitivan – kompeticijski postotak manji ili jednak 45% ($S/N \% \leq 45\%$)
- sumnjiv – kompeticijski postotak veći od 45% i manji od 50% ($45\% < S/N \% < 50\%$)
- negativan – kompeticijski postotak veći ili jednak 50% ($S/N \% \geq 50\%$)

3.4. Ingezim influenza A test

Uz komercijalni komplet za izvođenje imunoenzimnog testa „(ELISA) ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species“ (ID.vet, Grables, Francuska) u istraživanju je korišten i komercijalni komplet „Ingezim Influenza A“ (Inmunologia y Genetica Aplicada, S.A., Madrid, Španjolska). Izvedba cjelokupnog postupka načinjena je sukladno uputama proizvođača uz modifikaciju u pripremi seruma za pretraživanje. Korišteni dijagnostički komplet namijenjen je za otkrivanje specifičnih serumskih protutijela za antigen virusa influence A u uzorcima seruma podrijetlom od različitih vrsta životinja. U uputama proizvođača navodi se postupak pripreme seruma za pretraživanje, podrijetlom od konja, svinja i više vrsta ptica, ali ne i pitomih vretica. Modifikacija postupka očitovala se u tome da su serumi pretraživanih životinja u pripremi za pretraživanje razrijeđeni puferskom otopinom za razrjeđivanje seruma, koja je sastavni dio kompleta, u omjeru 1:2 (50 µl otopine za razrjeđivanje i 50 µl uzorka).

U izvedbi dijagnostičke metode korišten je dijagnostički komplet koji sadržava:

1. Mikrotitracijske plitice s 96 jažica u koje je tijekom proizvodnje vezan antigen
2. Konjugat
3. Pozitivni kontrolni serum
4. Negativni kontrolni serum
5. Puferska otopina za razrjeđivanje seruma
6. Koncentrirana otopina za ispiranje (25x)
7. Otopina supstrata (TMB)
8. Otopina za zaustavljanje reakcije

Osim navedenoga za izvedbu pretrage korišten je sljedeći pribor i oprema:

1. Jednokanalna automatska mikropipeta zapremnine 10-100 µl (Eppendorf)
2. Monokanalna automatska mikropipeta zapremnine 10-100 µl (Eppendorf)
3. Čitač mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska)
4. Ispirač mikrotitracijskih plitica (Hydroflex, Tecan, Männedorf, Švicarska)

5. Tresilica
6. Termostat (BIOLAB 190, Angelantoni industrie, Massa Martana, Italija)
7. Erlenmayerova tikvica zapremnine 300 ml
8. Lateks rukavice
9. Nastavci za pipete

Uz navedeno za pripremu radne otopine za ispiranje od koncentrirane otopine za ispiranje koja je dio dijagnostičkog kompleta, korištena je i destilirana voda.

3.4.1. Izvođenje pretrage

Prije korištenja sve komponente komercijalnog ELISA kompleta, te pretraživani serumi temperiraju se na sobnu temperaturu (20-25°C).

U prvom koraku, u svaku jažicu mikrotitracijske plitice dodaje se automatskom jednokanalnom pipetom po 50 µl puferske otopine za razrjeđivanje seruma. Nakon toga dodaje se po 50 µl u dvije jažice pozitivnog, odnosno dvije jažice negativnog kontrolnog seruma, te po 50 µl pretraživanog seruma u po jednu jažicu. Na ovaj način se u svakoj jažici nalazi serum razrijeđen s puferskom otopinom u omjeru 1:2. Mikrotitracijska plitica se prekrije folijom i inkubira kroz 1 sat na 37°C u termostatu.

Nakon inkubacije isprazni se sadržaj jažica i plitica se ispiru pomoću ispiraća mikrotitracijskih plitica 4 puta s po 300 µl radne otopine za ispiranje. Radna otopina za ispiranje načini se prethodnim razrjeđivanjem koncentrirane otopine za ispiranje, koja je dio komercijalnog kompleta, s destiliranom vodom u Erlenmayerovoj tikvici u omjeru 1:25.

U svaku jažicu isprane mikrotitracijske plitice doda se 100 µl konjugata, hermetički zatvori prekrivanjem folijom, te se inkubira 30 minuta na 37 °C u termostatu. Nakon inkubacije ponovno se isprazne jažice mikrotitracijske plitice i isperu 5 puta s po 300 µl radne otopine za ispiranje pomoću automatskog ispiraća mikrotitracijskih plitica.

U sljedećoj fazi u svaku jažicu dodaje se po 100 µl supstrata te se plitica inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Iza inkubacije dodaje se u svaku jažicu mikrotitracijske plitice po 100 µl otopine za zaustavljanje reakcije razgradnje supstrata peroksidazom.

Rezultati se očitavaju pomoću čitača mikrotitracijskih plitica pri valnoj duljini 450 nm kroz 5 minuta, nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

3.4.2. Validacija testa

Sukladno uputama proizvođača, radi pouzdanosti i vjerodostojnosti postignutih rezultata svakog pojedinog pretraživanja, propisan je omjer srednje vrijednosti očitavanja kontrolnog pozitivnog i kontrolnog negativnog seruma koji jamči pouzdanost rezultata na pojedinoj mikrotitracijskoj plitici.

Test se smatra pouzdanim i postignuti rezultati valjanim ako je omjer srednje vrijednosti rezultata očitano za negativni kontrolni serum i srednje vrijednosti rezultata za pozitivni serum jednak ili veći od 3.

$$OD_{NC}/OD_{PC} \geq 3$$

3.4.3. Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih seruma

Nakon načinjene pretrage očitane su vrijednosti apsorbancije za svaki pojedini serum pomoću čitača mikrotitracijskih plitica na valnoj duljini od 450 nm.

Radi interpretacije rezultata izračunava se omjer očitane apsorbancije pojedinog pretraživanog seruma i srednje vrijednosti očitanih rezultata negativnog kontrolnog seruma, te se dobiveni broj množi sa 100 kako bi bio izražen u postocima.

Prema sljedećoj formuli izračunat je kompeticijski postotak za svaki pretraživani serum:

$$\% \text{ Kompeticije} = 100 - OD_{uzorka} / OD_{NC} \times 100$$

Sukladno vrijednosti kompeticijskog postotka rezultat pretrage pojedinog seruma može biti:

- Pozitivan – kompeticijski postotak je veći od 30%
- Negativan – kompeticijski postotak je manji od 30%
- Sumnjiv – ako je kompeticijski postotak veći od 25% i manji od 30%

4. REZULTATI

U provedenom istraživanju pretraženo je ukupno 39 uzoraka seruma pitomih vretica koje su bile pregledane i liječene na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ostatni uzorci seruma prikupljeni su i pohranjeni na temperaturu - 20°C u Centralnom laboratoriju navedene klinike.

Nakon komparativnog pretraživanja uzoraka pomoću dva komercijalna ELISA testa; ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species i Ingezim Influenza A®, dokazana su specifična protutijela za antigen virusa Influence A u ukupno 7 uzoraka pretraživanih seruma. Sveukupna seroprevalencija infekcija virusom influence A u pretraživanoj skupini pitomih vretica kućnih ljubimaca iznosila je visokih 17,9 %. Niti jedan uzorak nije rezultirao sumnjivim rezultatom. Oba testa su pokazala pozitivan nalaz za iste životinje, te s obzirom na preklapanje rezultata u oba testa, možemo govoriti koji uzorci su jače, odnosno slabije pozitivni, odnosno iz rezultata se može zaključiti ako se radi o nedavnoj infekciji ili o rezidualnim protutijelima (Tablica 3.)

	Broj uzoraka	Pozitivni	Sumnjivi	Negativni	Seroprevalencija
Pitome vretice	39	7	0	32	17,9 %

Tablica 1. Seroprevalencija infekcije virusom influence A u pitomih vretica u istraživanoj skupini

Analizom prikupljenih podataka ustanovljeno se da je pozitivno 7 pitomih vretica, od toga 4 su bile ženke i 3 mužjaka, dob pozitivnih životinja varirala je između 4 i 8 godina. Od svih pozitivnih, razlog dolaska zbog respiratornih simptoma bio je samo kod jednog mužjaka, starog 5 godina (uzorak broj 34). U njegovoj anamnezi saznajemo da je cijela obitelj također imala respiratorne simptome mjesec dana prije uzimanja uzorka za istraživanje. Njegov uzorak je uzet 27.10.2017., te se u oba testa pokazao izrazito pozitivan, što nam govori o visokom titru antitijela, odnosno nedavno preboljeloj infekciji. Sezona gripe ljudi u RH uglavnom počinje tijekom 11. mjeseca, ali ovaj rezultat dokazuje da je 2017. godine vjerojatno počela znatno ranije. Također se može vidjeti

na službenoj internetskoj stranici Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control) da je 2017. godine zabilježena gripa ljudi u Europi početkom 10. mjeseca (ANONIMNO, 2017a.; ANONIMNO 2017b.). Od ostalih pitomih vretica razlog dolaska na kliniku za tri pitome vretice je bio sistematski pregled prije udomljenja (uzorci 28, 31 i 37), te je nepoznata njihova anamneza o respiratornim bolestima i kontaktu s ostalim životinjama prije dolaska u Udrugu ljubitelja tvorova. Tijekom boravka u udruzi, pitome vretice čiji su uzorci broj 31 i 37 su boravili zajedno. Jedna pitoma vretica je pregledana zbog inzulinoma (uzorak broj 21), a dvije zbog tvorbe; unutar grudne šupljine kod jedne (uzorak 7), odnosno unutar perinealne vrećice kod druge pitome vretice (uzorak 26), te oni nisu pokazivali nikakve respiratorne simptome.

Broj uzorka	Spol	Dob	Razlog dolaska na kliničku obradu i klinički znakovi
7	M	6 god	<ul style="list-style-type: none"> - Tvorba u grudnoj šupljini - Dva mjeseca prije uzorkovanja doveden na kardiološku obradu, teže disao zbog izljeva u grudnu šupljinu, te cijelo vrijeme kašlje - U kućanstvu boravi s još dvije pitome vretice (jedna od njih je uzorak br. 26 koji je također pozitivan)
21	Ž	4 god	<ul style="list-style-type: none"> - Ima dijagnosticiran inzulinom - Nije pokazivala respiratorne simptome - U kućanstvu boravi s još jednom pitomom vreticom
26	Ž	8 god	<ul style="list-style-type: none"> - Pregledana zbog tvorbe unutar perinealne vrećice - Nema podataka o respiratornim simptomima - Boravi s još 2 pitome vretice (jedna od njih je uzorak br. 7)
28	M	6 god	<ul style="list-style-type: none"> - Sistematski pregled zbog udomljenja - Nepoznata anamneza
31	Ž	6 god	<ul style="list-style-type: none"> - Sistematski pregled zbog udomljenja - Nepoznata anamneza
34	M	5 god	<ul style="list-style-type: none"> - Na klinici pregledan zbog kroničnih respiratornih simptoma (zadnja tri mjeseca prije uzorkovanja) - Cijela obitelj mjesec dana prije uzimanja uzorka za istraživanje imala respiratorne simptome - U kućanstvu nema drugih pitomih vretica i ostalih životinja
37	Ž	4 god	<ul style="list-style-type: none"> - Sistematski pregled zbog udomljenja - Nepoznata anamneza

Tablica 2. Podaci o serološki pozitivnim pitomim vreticama na virus influence A, te nalaz pri obradi

Broj uzorka	Datum uzorkovanja	IDvet test %=S/N	INGEZIM test %=100-S/N*100
7	12.02.2017.	26,11 %	38,93 %
21	20.11.2017.	10,86 %	74,61 %
26	08.01.2018.	5,45 %	89,27 %
28	11.08.2017.	37,04 %	30,56 %
31	10.11.2017.	2,78 %	92,53 %
34	27.10.2017.	3,93 %	85,67 %
37	10.11.2017.	6,89 %	73,99 %

Tablica 3. Povezanost datuma uzorkovanja s rezultatima testova. ID vet <45% je pozitivan rezultat, >50% negativan rezultat; INGEZIM >30% je pozitivan rezultat, <30% negativan rezultata

5. RASPRAVA

Influenca je virusna bolest više vrsta životinja i ljudi, te kao takva predstavlja javnozdravstveni problem, naročito zbog čestih izmjena virusa i povremenih prelaska međuvrsne barijere. Iz ovog razloga, zadnjih godina pridodaje se sve veći značaj istraživanju influence na različite životinjske vrste. Pitome vretice su životinje koje su prirodno prijemljive na humani influenza virus, te mogu ponovno bolest prenjeti na čovjeka. Zato se one koriste kao modeli u istraživanjima influence, ali je zanemareno da su sve popularniji kućni ljubimci i zanemarena su istraživanja bolesti u prirodnim uvjetima držanja.

Do ovog istraživanja, u Republici Hrvatskoj nije provedeno niti jedno istraživanje infekcije pitomih vretica virusom influence. Stoga ovi rezultati predstavljaju prvi dokaz prisutnosti infekcije influence pitomih vretica na području Republike Hrvatske. Također nisu pronađeni podaci o istraživanju seroprevalencije influence pitomih vretica nigdje u svijetu.

Kako je istraživanje ciljano provedeno tijekom sezone gripe u ljudi, a pretraživane životinje su bile iz skupine kućnih ljubimaca, može se pretpostaviti da su pozitivne životinje potvrđene ovim istraživanjem inficirane humanim podtipovima virusa u izravnom dodiru s ljudima. Na žalost nismo bili u mogućnosti antigenski tipizirati protutijela da bi potvrdili ovu tezu.

U rezultatima se može vidjeti da je titar protutijela kod dvije pozitivne pitome vretice niži nego u ostalih, s obzirom na to da su u oba testa slabije pozitivni rezultati nego za ostale pitome vretice. To su dva mužjaka starosti 6 godina (uzorak broj 7 i 28). Od jednog je uzorak uzet 11.08.2017. (uzorak broj 28), što nam ukazuje na to da su pronađena protutijela vjerojatno ostala u serumu od bolesti preboljele u prethodnoj sezoni. Uzorak od druge slabije pozitivne pitome vretice je uzet 12.02.2017. (uzorak broj 7), kada je još uvijek trajala sezona gripe u ljudi, tako da ne možemo biti sigurni ako su ta protutijela od prethodne bolesti, ili je uzorak uzet na početku bolesti, a razlog dolaska na kliniku je bila tvorba u grudnoj šupljini, zbog koje je teže disao.

Svi ostali pozitivni uzorci, pokazali su se jako pozitivnima i uzeti su u periodu između 27.10.2017. i 08.01.2018., što bi odgovaralo periodu sezone gripe u ljudi.

Također iz prikupljenih podataka se vidi da su dvije pozitivne pitome vretice držane u istom kućanstvu (uzorak broj 7 i uzorak broj 26). Njihovi uzorci nisu bili uzeti u isto

vrijeme, tj. uzorak br. 7 je uzet 12.02.2017., a uzorak broj 26 je uzet 08.01.2018, tako da nisu bili inficirani u isto vrijeme.

Isto tako još tri pozitivna tvora boravila su u Udruzi ljubitelja tvorova, koji se brinu za napuštene tvorove, a to su uzorci broj 28, 31 i 37. Uzorak broj 28 je prikupljen 11.08.2017. kada je na kliniku došao na sistematski pregled zbog udomljenja, te nemamo podatke ako se družio s ostala dva pozitivna tvora iz udruge za koje imamo podatke da su boravili zajedno. Ostale dvije od 7 pozitivnih pitomih vretica se ne mogu međusobno povezati.

Utjecaj prikupljenih podataka (dob, spol, način držanja) i njihova statistička značajnost na broj serološki pozitivnih pretraživanih životinja zbog relativno malog broja uzoraka i posljedično malog broja obrađivanih podataka analizirani su Fisherovim testom (FISHER, 1922.). Analiza podataka pokazuje da rezultat nije značajan, odnosno da dob, spol i način držanja ne utječu na mogućnost infekcije influencom.

Kada se usporede podaci o istraživanjima influence na pitomim vreticama s drugim životinjama poput pasa, mačaka i konja, kod svih je vidljivo da postoji period od nekoliko desetaka godina tijekom kojih se istraživanja influence nisu provodila. Tada je bilo prihvaćeno mišljenje da zbog vrsne specifičnosti influenza kućnih ljubimaca ne predstavlja rizik od infekcije ljudi. Sve do početka ovog stoljeća kada se intenziviraju takva istraživanja i mogućnost međuvrsnog prijenosa, nakon dokaza infekcije ljudi virusom podtipa H5N1 u jugoistočnoj Aziji koji je prešao na ljude izravno s ptica bez obzira na značajne razlike u staničnim receptorima (CLASS i sur., 1998.).

U pasa infekcije virusom influence serološki su dokazivane u više istraživanja provedenih 70-ih godina prošlog stoljeća (NIKITIN i sur., 1972; KILBOURNE i KEHOE, 1975; CHANG i sur., 1976). Nakon više desetaka godina tijekom kojih su istraživanja influence pasa bila zanemarena, 2004. godine nakon epizootije respiratorne bolesti u pasa na Floridi, Sjedinjene Američke Države, u pasa je dokazana influenza konja H3N8 (CRAWFORD i sur., 2005.). Isti virus se prilagodio umnažanju u psima te nastaje pseći influenza virus (CIV) H3N8 koji se nastavio izravno širiti unutar populacije pasa (PAYUNGORN i sur., 2008.).

U mačaka je dokazana mogućnost infekcije u više slučajeva, ali nije česta kao u ostalih životinja. Opisan je slučaj mačke koja je pronađena mrtva u kući, te je obdukcija pokazala da je mačka uginula od posljedica infekcije pandemijskim sojem virusa influence H1N1 (KNIGHT i sur., 2016.), zatim izbijanje enzootije slabo patogenim

virusom influence A (H7N2) u skloništu za mačke, u kojem je virus s mačaka prenešen na radnika u skloništu (BELSER i sur., 2017.). U mačaka je također opisana i infekcija konjskim virusom influence A (H3N8) (SU i sur., 2014.).

Od drugih životinjskih vrsta, u magaraca je dokazana epizootija konjske influence H3N8 iako se rijetko pojavljuje u njih (YANG i sur.)

U Republici Hrvatskoj napravljeno je jedno istraživanje influence pasa i mačaka na području sjeverozapadne Hrvatske u kojemu je seroprevalencija u pasa kućnih ljubimaca iznosila je 0,9 %, a u mačaka 1,4%.(diplomski rad – Maja Šelimber).

6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija virusom influence A u pitomih vretica dokazana je po prvi put na području Republike Hrvatske serološkim dokazom specifičnih protutijela za nukleoprotein uzročnika.
2. Ukupna seroprevalencija u istraživanoj skupini pitomih vretica koje se drže kao kućni ljubimci iznosila je 17,9 %
3. Kod samo jedne od sedam pozitivnih životinja ustanovljeni su respiratorni simptomi, a u ostalih nisu ustanovljeni klinički znakovi koji bi se mogli pouzdano pripisati infekciji virusom influence, tako da su pozitivne životinje bile subklinički inficirane ili su dokazana protutijela posljedica ranije preboljene bolesti.
4. Influenca pitomih vretica je bolest koju treba uzeti u obzir u diferencijalnoj dijagnostici respiratornih bolesti pitomih vretica na području Republike Hrvatske
5. Dokazane infekcije virusom influence u pitomih vretica tijekom sezone influence u ljudi otvaraju pitanje njihove uloge u epidemiologiji influence u ljudi što zahtjeva daljnja istraživanja i suradnju veterinaru i liječnika u području javnog zdravstva.
6. U istraživanju nismo imali uzorke mladih pitomih vretica, tako da nismo dokazali prisutnost kolostralnih protutijela.

7. LITERATURA

ANDERWES, C.H., R. E. GLOVER (1941): Spread of infection from the respiratory tract of the ferret. I. Transmission of influenza A virus. *The British Journal of Experimental Pathology* 22(2), 91-97.

ANONIMNO (2017a): Weekly influenza update, week 40, 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/weekly-influenza-update-week-40-2017>, pristup 1. srpnja 2019.

ANONIMNO (2017b): Surveillance Atlas of Infectious Diseases. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>, pristup 1. srpnja 2019.

ASHA, K., B. KUMAR (2019): Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far!. *J Clin Med.* 2019 Feb 5;8(2). pii: E192.

BELL, F.R., J.A. DUDGEON (1948): An epizootic of influenza in a ferret colony. *J. Comp. Path*, vol. 58, 167-171.

BELSER, J.A., A.M. ECKERT, T.M. TUMPEY, T.R. MAINES (2016): Complexities in Ferret Influenza Virus Pathogenesis and Transmission Models. *Microbiology and Molecular Biology*, Vol. 80, No. 30, 733-744.

BELSER, J.A., J.A. PULIT - PENALOZA, X. SUN, N. BROCK, C. PAPPAS, H.M. CREAGER, H. ZENG, T.M. ZUMPEY, T.R. MALNES (2017): A novel A(H7N2) Influenza virus isolated from a veterinarian caring for cats in a New York City shelter causes mild disease and transmits poorly in the ferret model. *Journal of virology*, Volume 91, Issue 15, pii: e00672-17.

CAMPAGNOLO, E.R., M.E. MOLL, K. TUHACEK, A.J. SIMEONE, W.S. MILLER, K.O. WALLER, O. SIMWALE, J.T. RANKIN, S.M. OSTROFF (2012): Concurrent 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in Ferrets and in a Community in Pennsylvania. *Zoonoses and Public Health* 60(2), 117-124.

CHANG, C.P., A.E. NEW, J.F. TAYLOR, H.S. CHIANG (1976): Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan. *Int. J. Zoonoses* 3, 61–64.

CLAAS, E. C., A. D. OSTERHAUS, R. VAN BEEK, J. C. DE JONG, G. F. RIMMELZWAAN, D. A. SENNE, S. KRAUSS, K. F. SHORTRIDGE, R. G. WEBSTER (1998): Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-477.

CRAWFORD, P.C., E.J. DUBOVI, W.L. CASTLEMAN, I. STEPHENSON, E.P. GIBBS, L. CHEN, C. SMITH, R.C. HILL, P. FERRO, J. POMPEY, R.A. BRIGHT, M.J. MEDINA, C.M. JOHNSON, C.W. OLSEN, N.J. COX, A.I. KLIMOV, J.M. KATZ, R.O. DONIS (2005): Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 310, 482–485.

FISCHER, J.W., P. SCOTT (1944): An epizootic of influenza A in a ferret colony. *Canadian Journal of Public Health*, Vol 35, No. 9, 364-366.

FISHER, R. A. (1922): On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*, 85(1), 87-94.

FOX, J.G., R.P. MARINI (2014): Biology and diseases of the ferret, 3rd edition, *Viral diseases of the ferrets*, 467-471.

HUI-TING, L., W. CHING-HO, W. WEN-LING, C. CHAU-HWA, L.C. WANG (2014): Natural A (H1N1) pdm09 influenza virus infection case in a pet ferret in Taiwan. *Japanese Journal of Veterinary Research* 62(4), 181-185.

KENDRICK, R.E. (2000): Ferret respiratory diseases, *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 3(2), 453-64.

KILBOURNE, E.D., J.M. KEHOE (1975): Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs. *Intervirology* 6, 315–318.

KNIGHT, C.G., J.L. DAVIES, T. JOSEPH, S. ONDRICH, B.V. ROSA (2016): Case report – Pandemic H1N1 influenza virus infection in a canadian cat. *Can. Vet. J.* 57, 497-500.

LANGLOIS, I. (2005): Viral diseases of ferrets. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 8, 139-66.

MADIĆ, J., LJ. BARBIĆ, V. SAVIĆ (2018): Animal influenza outbreaks in Croatia: A review on the occasion of centenary of the 1918 influenza pandemic. *Rad Croatian Academy of Sciences and Arts. Medical science : Medical Sciences*, No. 533=45, 11-33.

MAHER, J.A., J. DESTEFANO (2004): The ferret: An animal model to study influenza virus. *Lab. Animal*, 33 (9), 50-53.

MUNSTER, V.J., E. de WIT, J.M.A. van der BRAND, S. HERFST, E.J.A. SCHRAUWEN, T.M. BESTEBROER, D. von de VIJVER, C.A. BAUCHER, M.KOOPMANS, G.F. RIMMELZWAAN, T. KUIKEN, A.D.M.E. OSTERHAUS, R.M.A. FOUCHIER (2009): Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*, vol 325, 481-483.

NIKITIN, A., D. COHEN, J.D. TODD, F.S. LIEF (1972): Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs. *Bull. World Health Organ.* 47, 471–479.

PATTERSON, A.R., V.L. COOPER, K.J. YOON, B.H. JANKE, P.H. GAUGER (2009): Naturally occurring influenza infection i a ferret (*Mustela putorius furo*) colony. *J. Vet. Diagn. Invest* 21, 527-530.

PAYUNGPORN, S., P.C. CRAWFORD, T.S. KOUO, L.M. CHEN, J. POMPEY, W.L. CASTLEMAN, E.J. DUBOVI, J.M. KATZ, R.O. DONIS (2008): Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 902–908.

PRATELLI, A., V. COLAO (2014): A population prevalence study on influenza infection in dogs in Southern Italy. *New Microbiol.* 37, 277-283.

SMITH, W., M.D. MANCH, C.H. ANDREWES, M.D. LOND, P.P LAIDLAW, B.CHIR (1933): A virus obtained from influenza patients. *Lancet* Volume 222, Issue 5732, 66-68.

SMITH, W., M.D., C.D. STUART-HARRIS, M.D., M.R.C.P. (1936): Influenza infection of man from the ferret. *Lancet* Volume 228, Issue 5890, 121-123.

SU, S., L. WANG, X. FU, S. HE, M. HONG, P. ZHOU, A. LAI, G. GRAY, S. LI (2014): Equine influenza A (H3N8) virus infections in cats. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (20), 2096-2099.

SWENSON, S.L., L.G. KOSTER, M. JENKINS-MOORE, M.L. KILLIAN, E.E. DEBESS, R.J. BAKER, D. MULROONEY, R. WEISS, J. GALEOTA, A. BREDTHAUER (2010): Natural cases of 2009 pandemic H1N1 Influenza A virus in pet ferrets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(5), 784-788.

WEESE, J.S., M. FULFORD (2011): Companion animal zoonoses, *Viral diseases*, 246-251.

YANG, H., Y. XIAO, F. MENG, F. SUN, M. CHEN, Z. CHENG, Y. CHEN, S. LIU, H. CHEN (2017): Emergence of H3N8 equine influenza virus in donkeys in China in 2017. *Veterinary Microbiology* 214, 1–6.

8. SAŽETAK

Prirodne infekcije pitomih vretica – kućnih ljubimaca tijekom sezone influence u ljudi

Pitome vretice su jedina vrsta domaćih životinja koje su prirodno prijemljive na viruse humane influence, te su često zaražene od strane vlasnika. Virusi influence pripadaju porodici Orthomyxoviridae, te su podijeljeni u četiri tipa: tip A, B, C i tip D. U pitomih vretica infekcija virusom influence tip B češće uzrokuje blaže simptome, za razliku od infekcije influencom tipa A. Simptomi su slični onima koji se javljaju kod ljudi: fotofobija, kataralni iscjedak iz nosa, kihanje, kašljanje, povišena temperatura, smanjen apetit i malaksalost. Do infekcije dolazi inhalacijom aerosoliziranih kapljica, a može se pojaviti između pitomih vretica, pitomih vretica i ljudi, kao i ljudi i pitomih vretica.

Cilj ovog istraživanja bio je po prvi put ispitati prisutnost i prevalenciju infekciju virusom influence A kod kućno držanih pitomih vretica. Ukupno je ispitano 39 seruma pitomih vretica pomoću dva komercijalna ELISA testa (ID Screen Influenza A Antibody Competition Multispecies test i Ingezim influenza A test). Od ispitanih 39 uzoraka, u njih 7 pronađena su antitijela za nukleoprotein influence A, te ukupna seroprevalencija iznosi 17,9 %. Epizootiološki se mogu povezati dvije pozitivne pitome vretice koje su držane zajedno u kućanstvu, kao i tri pitome vretice koje su jedan period boravile u Udruzi ljubitelja tvorova, od njih dvije su boravile zajedno, a treću ne možemo povezati s njima.

Ovaj rad predstavlja prvi dokaz o influenci kućno držanih tvorova u Republici Hrvatskoj i naglašava važnost razmatranja virusa influence u diferencijalnoj dijagnozi kod pojave respiratornih simptoma pitomih vretica.

S obzirom na relativno mali broj uzoraka (39), i visok postotak pozitivnih životinja (njih 7), prvi dokaz infekcije pitomih vretica influencom tip A na području Republike Hrvatske predstavlja velik značaj za dijagnostiku te bolesti kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu.

Seroprevalencija od 17,9 % ukazuje nam na visok morbiditet pitomih vretica virusom influence, a samim time i da pitome vretice sudjeluju u širenju virusa influence.

Također, dokaz infekcije pitomih vretica pitomih vretica virusom influence tijekom sezone gripe u ljudi predstavlja važnu smjernicu za javno zdravstvo, kao i za daljnja

istraživanja infekcija influencom na ovim životinjama, s ciljem određivanja značaja kućnih ljubimaca u širenju bolesti na ljude.

9. SUMMARY

Natural infections of ferrets – pets during the season of influenza in humans

Ferrets are the only domestic animal species naturally susceptible to human influenza viruses, and are often infected by their human owners. Influenza viruses belong to the Orthomyxoviridae family, and they are divided into four types: A, B, C, and D. Influenza type B frequently produces a milder illness on ferrets than does influenza type A. Signs are similar to those in humans: photophobia, catarrhal nasal discharge, sneezing, coughing, pyrexia, anorexia, and malaise. Transmission occurs by inhalation of aerosolized droplets, and can occur between ferrets, ferrets and humans, or humans and ferrets.

The aim of this study was to investigate the presence and prevalence of influenza A virus infection in household ferrets for the first time. A total of 39 ferrets sera samples were tested by two commercial competitive ELISA tests (ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species and Ingezim influenza A). Out of 39 sera samples specific antibodies for influenza A nucleoprotein were detected in sera of seven animals. The overall seroprevalence was 17.9%. There was two correlation of epidemiological data between two positive ferrets, that was kept together in the household, as well as three ferrets that stayed for a period in TVORUM, where two of them stayed together, and the third one we can not associate with them.

This is the first report of influenza in household ferrets in Croatia and highlights the importance of considering influenza virus in the differential diagnosis for ferrets respiratory distress.

Despite the relatively low number of conducted samples (only seven of them) and fairly high percentage of infected (positive) ferrets, first evidence of infection in ferrets with type A on the territory of the Republic of Croatia represents a great importance in diagnostic plan for this disease not only in Croatia, but worldwide. Seroprevalence of 17,9 % indicates a high morbidity of ferrets by the influenza virus, and in this way, ferrets participate in the spread of the influenza virus.

Also, the evidence of a ferret infection of the influenza virus during the season of influenza in humans is an important guideline for public health as well as for further investigation of influenza infections on these animals, with the aim of determining the importance of pets to the spread of disease to humans.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01. ožujka 1993. g. u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Milana Langa u Bregani, 2007. godine upisala sam Srednju veterinarsku školu u Zagrebu. Sva četiti razreda srednje škole završila sam s odličnim uspjehom, ali za upis na Veterinarski fakultet je trebalo još puno truda na državnoj maturi zbog velike konkurencije gimnazijskih maturanata prema strukovnoj školi. Veterinarski fakultet u Zagrebu sam upisala na jesenskom upisnom roku 2011., ali to me nije pokolebalo, te sam svaku akademsku godinu završila uspješno. Tijekom studiranja radila sam nekoliko studentskih poslova, od kojih sam najviše vremena posvetila radu u Lego storeu. Od znanstvenih i stručnih skupova sudjelovala sam na Veterinarskom seminaru male prakse, održanom u Zagrebu 03.09.2016., zatim na 7. Internacionalnom kongresu "Veterinarska znanost i struka", u Zagrebu, 05.-07.10.2017., te na „EERVC 3rd Eastern European Regional Veterinary Conference“ također u Zagrebu, 04.-06.10.2018. Jako volim životinje, te od kućnih ljubimaca imam jednog psa i 5 mačaka kojima posvećujem svo svoje slobodno vrijeme.