

Utjecaj veličine i strukture populacije divljih svinja na epizootiologiju bolesti Aujeszzkoga

Sučec, Ivica

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:178:481790>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Ivica Sućec, dr. med. vet.

**Utjecaj veličine i strukture populacije
divljih svinja na epizootologiju bolesti
Aujeszzkoga**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
Veterinary Faculty

Ivica Sućec, DVM

**Influence of wild boar population size
and structure on epizootiology of
Aujeszky disease**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021



University of Zagreb
Veterinarski fakultet

Ivica Sućec, dr. med. vet.

**Utjecaj veličine i strukture populacije
divljih svinja na epizootologiju bolesti
Aujeszzkoga**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, Dipl. ECZM

izv. prof. dr. sc. Lorena Jemeršić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
Veterinary Faculty

Ivica Sućec, DVM

**Influence of wild boar population size
and structure on epizootiology of
Aujeszky disease**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Assoc. Prof. Dean Konjević, Dipl. ECZM
Assoc. Prof. Lorena Jemeršić

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Ivica Sućec, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Ivica Sućec
(potpis studenta)

Zagreb, 2021.

Doktorski rad izrađen je na Zavodu za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentori: izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, izv. prof. dr. sc. Lorena Jemeršić

Predstojnik: doc. dr. sc. Denis Cvitković

Doktorski rad ima:

103 stranice

12 slika

11 tablica

ZAHVALE

Zahvaljujem kolegi i mentoru izv. prof. dr. sc. Deanu Konjeviću na izuzetno stručnom i poticajnom vodstvu, na svim korisnim savjetima i razgovorima te na pomoći tijekom pisanja i izrade cijeloga doktorskoga rada.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Loreni Jemeršić na stručnom i vrlo kolegijalnom vodstvu i savjetima prilikom osmišljavanja teme te na pomoći u analizama i pisanju rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Krešimiru Krapincu, dr.sc. Tomislavu Kerosu, dr. sc. Miljenku Bujaniću i Nikolini Škvorc , dr. med. vet. na pomoći u izradi rada.

Zahvaljujem Hrvatskim šumama, Šumarskom fakultetu, lovištu Črnovščak, LD „Jelen“ Divuša i LD „Lane“ Bućica na ustupanju neophodno potrebnih uzoraka.

Zahvaljujem i svim prijateljima na potpori i razumijevanju.

Na kraju, posebno zahvaljujem svojim roditeljima i supruzi na bezuvjetnoj i iskrenoj podršci, na strpljenju i pomoći, kako u drugim segmentima života, tako i pri izradi ovog doktorskog rada. Također, velika hvala Cviti i Toniju.

POPIS PRILOGA – DIO I. SLIKE

Slika 1. Gustoća divljih svinja po administrativnim jedincima po kilometru kvadratnom u 2018. godini i područja koja nastanjuju divlje svinje

Slika 2. Primjerci odraslih divljih svinja

Slika 3. Krdo divljih svinja na hrani noću

Slika 4. Mapa lokacija uzorkovanja sa prikazom reljefa

Slika 5. Glava divlje svinje

Slika 6. Oguljena koža i rezovi na lubanji

Slika 7. Otvaranje lubanje

Slika 8. Uzorkovanje njušnih lukovica

Slika 9. Logistička regresija

Slika 10. Omjer serološki pozitivnih i negativnih grla prema lokaciji uzorkovanja

Slika 11. Odnos prevalencije u dobnim kategorijama ukupno i prema spolu

Slika 12. Prikaz pozitivnih i negativnih grla te prevalencije prema županijama

POPIS PRILOGA – DIO II. TABLICE I GRAFIKONI

Tablica 1. Geografska lokacija površina i bonitetni razred lokacija uzorkovanja

Tablica 2. Broj uzoraka prema lokaciji

Tablica 3. Prikaz broja uzoraka po dobnoj i spolnoj strukturi

Tablica 4. Rezultati nalaza ELISA AB gpl IDEXX po lokalitetima

Tablica 5. Podaci o životinjama i nalaz pretraga

Tablica 6. Rezultati testa ispitivanja razlika u rezultatima ELISA AB gpl IDEXX testa među dobnim kategorijama

Tablica 7. Rezultati testa ispitivanja razlika u rezultatima ELISA AB gpl IDEXX testa među spolnim kategorijama

Tablica 8. Izbor modela procjene zaraženosti svinja

Tablica 9. Točnost procjene zaraženosti divlje svinje s obzirom na model

Tablica 10. Parametri modela procjene zaraženosti svinja

Tablica 11. Ovisnost relativne odstrelne kvote divlje svinje o tipu šumskih sastojina i udjelu šumskih površina u lovištima Slovačke u razdoblju 1978.-1980.

Sadržaj

SAŽETAK

EXTENDED ABSTRACT

1. Uvod.....	1
2. Pregled dosadašnjih spoznaja	3
2.1. Divlja svinja (<i>Sus scrofa</i> L.).....	3
2.1.1 Povijesni pregled, rasprostranjenost i brojno stanje u Hrvatskoj	3
2.1.2 Izgled, građa tijela i razmnožavanje	6
2.1.3 Prehrana	8
2.1.4 Stanište, način života i ponašanje divljih svinja	9
2.1.5 Bolesti divljih svinja	10
2.2. Bolest Aujeszzkoga.....	12
2.2.1 Povijest i nazivlje bolesti Aujeszzkoga	12
2.2.2. Etiologija	12
2.2.3. Epizootiologija bolesti Aujeszzkoga	14
2.2.4 Klinička slika u domaćih svinja, divljih svinja i pasa	16
2.2.5. Dijagnostika.....	17
2.2.6. Profilaksa i liječenje.....	18
2.3. Seroprevalencija i izolacija virusa iz divljih svinja u državama Europe	19
3. Obrazloženje teme	21
4. Materijal i metode	22
4.1. Uzorkovanje	22
4.1.1. Opis lokacija uzorkovanja	22
4.1.2. Broj uzoraka	25
4.2 Vrsta uzoraka i način uzorkovanja	27
4.3 Metode pretraživanja uzoraka	29

4.3.1 Serološko pretraživanje uzoraka seruma imunoenzimskim testom (ELISA)	29
4.3.2 Priprema uzorka za dokazivanje DNK bolesti Aujeszkoga	30
4.3.2.1 Izolacija DNK na 96-jažičnim mikrotitracijskim pliticama	31
4.3.2.2 Korišteni uređaji i oprema	31
4.3.2.3 Reagensi	32
4.3.2.4 Biološki materijali	32
4.3.2.5 Pripremanje otopina za rad	33
4.3.2.6 Postupak	33
4.3.2.7 Produkti	34
4.3.3 Umrežena lančana reakcija polimerazom (Nested polymerase chain reaction)	35
4.3.4 Analiza PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu	36
4.3.5 Dokazivanje DNK virusa bolesti Aujeszkoga lančanom reakcijom u stvarnom vremenu (RT-PCR)	37
4.3.5.1. Priprema uzoraka za qRT-PCR u 0,2 ml epruveti	38
4.3.5.2. Kriteriji za procjenu valjanosti rezultata	39
4.4 Epidemiološke i statističke analize	40
5. Rezultati	46
5.1. Rezultati seroloških i molekularnih analiza	46
5.2. Razvoj modela za procjenu vjerojatnosti zaraženosti virusom bolesti Aujeszkog	58
6. Rasprava	64
7. Zaključci	74
8. Popis literature	75
9. Životopis autora s popisom objavljenih znanstvenih radova	96

SAŽETAK

Divlju svinja nalazimo u gotovo cijeloj Europi i Aziji te manjim dijelom u Africi i Sjevernoj Americi. U Republici Hrvatskoj nastanjuje gotovo sve njene dijelove izuzev pojedinih manjih otoka. Zbog brojnih čimbenika, prije svega povećane plodnosti, iskorjenjivanja bolesti, malog broja prirodnih neprijatelja, obilja prirodne i dodane hrane u staništima i načina gospodarenja u zadnjih 20-ak godina njena populacija neprestano raste. Divlja svinja je potencijalni nositelj različitih uzročnika bolesti prenosivih na ljude i domaće životinje te je neophodno poznavati njenu ulogu u epizootiologiji zaraznih i parazitskih bolesti. Ciljevi ovoga istraživanja su: i) utvrditi prevalenciju protutijela na virus bolesti Aujeszzkoga u divljih svinja, ii) utvrditi postoje li razlike u pojavnosti seropozitivnih grla u odnosu na dobnu strukturu, spol i geografsko područje u pretraživanih divljih svinja, iii) utvrditi postoji li korelacija u pojavnosti seropozitivnih nalaza u odnosu na brojnost i gustoću populacije divlje svinje u određenom području i iv) utvrditi odnos seropozitivnih PCR pozitivnih grla. Ukupno su prikupljena 222 uzorka divljih svinja (krv, slezena, kranijalni dio plućnog krila i njušna lukovica) iz Parka prirode Medvednica i 10 lovišta kontinentalnog staništa. Niti jedan uzorak njušnih lukovica, slezene ili kranijalnog dijela pluća nije bio pozitivan PCR pretragom na virus bolesti Aujeszzkoga, dok je ukupna prevalencija serološki pozitivnih divljih svinja na virus bolesti Aujeszzkoga iznosila 33,78%. Prema spolu, prevalencija u mužjaka iznosi 25,26%, a u ženki 40,15%. Omjer izgleda (*odds ratio*) u ovom slučaju iznosi 1,9852 što ukazuje kako je 1,9 puta veća vjerojatnost da će ženke biti pozitivne u odnosu na mužjake. Dodatno su spolni razredi raščlanjeni na dobne kategorije pa je utvrđena seroprevalencija u prasadi od 10%, u kategoriji grla od 1 do 2 godine 27,53%, a u grla starijih od dvije godine 65,75%. Statistički su znakovite vrijednosti u godišnjaka i grla u drugoj godini sa tri puta većom

vjerojatnosti da će ženke biti pozitivne, dok u kategoriji prasadi i grla starijih od dvije godine vrijednosti nisu statistički znakovite. Ispitivanje razlika između dobnih razreda unutar svakog spola pokazala je statistički znakovite razlike između skupina pa su tako veprovi znakovito učestalije pozitivni od nazimadi, dok su krmače učestalije pozitivne u odnosu na žensku prasadu i nazimice. Testovi su pokazali da kod jednog i kod drugog spola frekvencija pozitivne prasadi ne utječe na frekvenciju pozitivne nazimadi, dok u svim ostalim kombinacijama frekvencije pokazuju povezanost. Promatrano prema lokaciji uzorkovanja usporedbom pozitivnih i negativnih grla na području Zagrebačke i Sisačko-moslavačke županije te na području Osječko-baranjske i Sisačko-moslavačke županije dobivena je statistički znakovita razlika. Prema kriteriju $\Delta AIC < 2$ izdvojen je 21 model procjene (predviđanja) zaraženosti virusom bolesti Aujeszzkog. Predloženim modelima moguće je procijeniti zaraženu ili nezaraženu životinju s prosječnom točnošću od 77,12 do 78,67 %. U razvoju 21 modela korišteno je 12 pretkazivača. Oni se mogu razdvojiti na pretkazivače populacije (dobni razredi, spol, gustoća populacije i relativna odstrelna kvota), pretkazivače lovne tehnike (tehnika lova) i pretkazivačestaništa (nadmorska visina te udio pojedinih kategorija korištenja prostora). Kao najučestaliji pretkazivači javljaju se dobni razredi, koji su uvršteni u sve modele. Predznaci koeficijenata dobiveni logit regresijom ukazuju na konačnu vrijednost zavisne varijable. Koeficijent dobnih razreda ima pozitivan predznak, dok koeficijenti udio travnjaka, udio oranica i gustoća populacije imaju negativan predznak. Ovo ukazuje da s povećanjem dobi jedinke raste vjerojatnost da će jedinka u populaciji biti pozitivna na bolest Aujeszzkog. S druge strane, što je manji udio travnjaka, oranica i šikara veća je disperzija svinja i mogućnost prijenosa uzročnika na veće udaljenosti. Modeli su pokazali kako je manja gustoća populacije povezana s nižom prevalencijom, dok porastom gustoće se ne bilježi i proporcionalni porast prevalencije. Rezultati ovog istraživanja podudarni su s rezultatima na području susjedne Slovenije. Na temelju dobivenih podataka moguće je zaključiti kako je u održavanju virusa bolesti Aujeszzkoga u populaciji divljih svinja od iznimnog

značaja stres uvjetovan sezonom parenja i sezonom lova tehnikom prigona, a da bitnu ulogu u prijenosu uzročnika imaju veprovi. Također za pretpostaviti je kako je većina infekcija u divljih svinja latentne naravi.

Ključne riječi: divlja svinja, bolest Aujeszzkoga, epizootiologija, seroprevalencija

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION: The Eurasian wild boar is widespread in Europe and Asia, and to a lesser extent in Africa and North America. In most of Europe, as well as in the Republic of Croatia, the wild boar population size has been increasing constantly over the recent years. The exception is currently Eastern Europe itself, where a significant drop in numbers has occurred locally due to the outbreak of African swine fever. In other parts of Europe, on the other hand, wild boar are coming closer and closer to settlements, and are even found in some larger cities. This fact is extremely important given that the wild boar is a potential reservoir of numerous viral and bacterial diseases transmitted not only to domestic pigs, but also to other domestic animals and humans. It is in recent times that African swine fever has focused research on the epidemiology of wild boar diseases, primarily due to the potential spread to domestic pigs and the incalculable damage that can therefore occur in pig production. In this study, the emphasis is on Aujeszky's disease. This disease can cause great economic damage in domestic pig production and is therefore controlled by preventive vaccination and

the "stamping out" method. As the disease is enzootic in wild boar (RUIZ-FONS, 2017), it poses a constant threat to domestic pig production. On the other hand, the risk for the population of hunting dogs, which often come into contact with the virus during regular hunting activities or through feed with raw meat and offal of shot wild boars, should be emphasized. In Croatia, interspecific transmission of the virus has been proven, and virus strains isolated from domestic, wild boar and dogs are genetically highly matched (KEROS et al., 2015). As the previous research was mainly focused on seroprevalence, comparison of serological findings and virus detection by molecular methods on samples originating from the same wild boar was performed in this research. Also, a comparison of demographic indicators of the population with the obtained search results was performed, as well as a comparison of the findings with the characteristics of environmental factors, peculiarities in light of different rating classes, total hunting area and hunting productive areas. In this way, we tried to determine which indicators may indicate an increased risk of developing this disease in the wild boar population. Finally, as wild boar have a complex social structure, it was necessary to take those factors into consideration.

REVIEW OF THE LITERATURE: Wild boars inhabiting the European continent belong to one species, the Eurasian wild boar (*Sus scrofa* L). In the Republic of Croatia, wild boar is present in all its parts except certain Adriatic islands. The wild boar genotype in these areas has been preserved to date with a limited effect of hybridization on genetic structure (ALEXANDRI et al., 2012). In the period immediately after the Second World War, in the Republic of Croatia, the number was estimated at only 300 individuals (DARABUŠ AND JAKELIĆ, 1996), and the reason for such a small population are war casualties, large numbers of predators and the presence of

classical swine fever virus. The wild boar population is constantly growing not only in Croatia, but also in the rest of Europe after the Second World War (SÁEZ-ROYUELA and TELLERÍA, 1986). According to official records, the number of wild boars in the Republic of Croatia ranges from 30,000 to 60,000, while hunting bag in the past few years ranges from 29,500 to 30,000 per year (ANONIMUS, 2018). Pigs are extremely social animals, except for boars that leave the herd at the age of two. The herd is led by an old sow, and consists of several sows, and piglets (JANICKI et al., 2007). Wild boars suffer from the same diseases as domestic ones, so it is necessary to single out some of the most common diseases such as brucellosis, classical swine fever, African swine fever, trichinosis, hepatitis E, Aujeszky's disease, parvovirus infection, circovirus infection of pigs type 2, reproductive and respiratory pigs (JEMERŠIĆ et al., 2019). Furthermore, it is important to note that wild boar are a possible reservoir of numerous viral infections such as reproductive and respiratory syndrome in pigs, porcine circovirus infections type 2 and parvovirus infections (ROIĆ et al., 2005, 2006, 2012). Wild boar have important role in the spread of various diseases, some of which are zoonoses, and poses a potential risk to the health of domestic and feral pigs, and in some situations to human health. In epidemiological terms, the fact that the wild boar is a social animal, with the exception of adult males, its role as a reservoir of a number of different pathogens is growing (ACEVEDO et al., 2007) due to such living conditions with its current distribution and number. Aujeszky's disease or pseudorabies is an acute viral infection of domestic and wild animals. This disease was first mentioned in the United States in 1813 under the name "Mad Itch", and in Europe in 1889 in Switzerland. The first record in Croatia dates from 1904 (CVETNIĆ, 1997). Aujeszky's disease virus is swine herpesvirus 1 (Suid herpesvirus-1 or SuHV-1). It is a DNA virus belonging to the family Herpesviridae, the subfamily Alphaherpesvirinae and the genus

Varicellovirus. The virus is easily maintained in an environment that can serve as a permanent source of infection, as evidenced by the fact that airborne transmission has been reported between Germany and Denmark in areas of high pig density (CHRISTENSEN et al., 1990, 1993). Also, it is important to note that it is rapidly inactivated by ultraviolet rays as well as pH lower than 6 and higher than 11. A total of four major genotypes of Aujeszky's disease virus in wild boar have been demonstrated, of which Type I was found in the US and Central Europe, Type II and Type III in Central and Northern Europe, and Type IV in Asia (MÜLLER et al., 2011). The virus has tropism on the respiratory and nervous systems, multiplying in the body of a large number of animals, including almost all mammals, which serve as the ultimate host (METTENLEITER, 2000). The disease occurs mainly in pigs, and sporadically in other species. In domestic pigs, it is mainly transmitted by droplet infection, primarily due to the density of pigs on the farm (PACINI et al., 2020), and is retained for up to 6 months after recovery. If sows are infected, they can spread the virus via milk and uterus. Wild boars mainly transmit the virus sexually during mating (ROMERO et al., 2001), although droplet transmission within the herd during the year should not be neglected. It can also be found in the lungs of healthy animals, in which, after a drop in immunity, it multiplies rapidly and its virulence increases. This phenomenon makes it difficult to find the source of the infection (CVETNIĆ, 1997). PACINI et al. 2020. isolated the virus in the fetus of seropositive feral pigs in the endemic region of Italy, which suggests possible new ways of transmitting the virus and the pathogenetic role of the virus in wild boar. Carnivores contribute to the spread of the virus, by spreading the virus further with carcasses and their parts. Carnivores become infected mainly orally by eating raw meat and offal. The virus initially multiplies in the nasopharynx and is present in the nasal discharge for the first ten days after infection. The virus penetrates

the lymph nodes of the pharynx and nose, from where it reaches the nerves in the pons and medulla. After penetrating the central nervous system, it spreads rapidly and can be found in the lumbar and sacral segments of the spinal cord. What is especially important to state is that the pig is the only host that can survive the infection and serve as a reservoir for the virus. Infection with this virus, as in the case of other herpesviruses, can lead to permanent infection in pigs (METTENLEITER et al., 2012), or to viral latency (WIDEN et al., 2012), which is mainly established in the cells of the trigeminal and sacral ganglia. (ROMERO et al. 2003; METTENLEITER et al., 2012). This also tells us that the cells of the central nervous system neurons are the sites of latent infection with this virus (BROWN et al., 1995). Due to the action of certain stressors, the latent virus can be reactivated in the tonsils and other tissues (WITTMANN et al., 1983; METTENLEITER et al., 2012). Aujeszky's disease virus can be confirmed in live pigs in swabs of the nose and tonsils and in oropharyngeal fluid. Postmortem examination can also confirm it in peripheral organs such as the brain, spleen and lungs. In domestic pigs that are latently infected, the virus can be confirmed in the trigeminal ganglia, while in wild pigs it can also be confirmed in the sacral ganglia. Aujeszky's disease can result in trade restrictions as well as significant economic losses. Eradication programs can successfully keep the disease under control, but the virus is still maintained in the wild boar population and thus poses a constant threat to the domestic pig population, and can sporadically cause the disease in other animals, such as hunting dogs. European countries have very different data on the seroprevalence of Aujeszky's disease in the wild boar population, and research shows that this virus is widespread. The available data show that seroprevalence varies considerably between different regions of Europe, and also within the areas of low seroprevalence, areas with moderate or low seroprevalence of Aujeszky's disease

virus have been identified (MEIER et al., 2015). Thus, according to available data, high seroprevalence of Aujeszky's disease virus was found in feral pigs in the Mediterranean countries as well as in Central and Eastern European countries, while moderate to low seroprevalence was found in Central and Northern European countries. In the Republic of Croatia, previous studies have found a high seroprevalence of 54.54% in the area of Moslavačka gora (ŽUPANČIĆ et al., 2002) and 38.5% in 4 localities of the continental wild boar habitat (ROIĆ et al., 2012). In addition, the virus was successfully isolated (JEMERŠIĆ et al., 2012; KEROS et al., 2014). High seroprevalence in certain European countries poses a risk for further spread of Aujeszky's disease in the wild boar population, but also domestic, despite efforts to eradicate this disease. Seroprevalence ranges in certain countries, primarily France, Spain, Italy and Croatia, indicate heterogeneity within different wild boar habitats and population characteristics. The characteristics of Aujeszky's disease virus infection in feral pigs have been investigated in several countries, and uneven results in clinical signs and mortality of piglets have been demonstrated, while the level of seroprevalence was related to age and sex (MÜLLER et al., 2011). CASADES-MARTI et al. (2019) found that a high proportion of seropositive individuals in the population increases the likelihood of infecting wild boar that have not previously been in contact with the virus and that the only factor that can assess infection pressure is the emergence of new infections during the first year of wild boar life (piglet category). For Croatia, it is important to note that the transmission of the virus from species to species (wild boar - dog) for which a high genetic match with the strain of wild and domestic swine virus has been established has been proven (KEROS et al., 2015).

MATERIAL AND METHODS: Sampling was carried out in the continental, lowland and mountain habitats of the Republic of Croatia. Samples were collected in 10 hunting grounds and in the area of the Medvednica Nature Park (a total of 11 localities). The sites are located in five counties and the City of Zagreb. Specifically, sampling was carried out in two hunting grounds in Zagreb County, four hunting grounds in Sisak-Moslavina County, one hunting ground in Karlovac County, one hunting ground in Varaždin County, two hunting grounds in Osijek-Baranja County and in the Medvednica Nature Park (City of Zagreb). This selection of sampling sites included three different rating classes, as well as three habitat types (lowland, hilly and mountainous). The total area of all sampling sites is 101817 ha. At the same time, sampling included wild boar populations in the wild (open hunting grounds) and in fenced hunting grounds. A total of 222 wild boar were sampled. Wild boars were shot according to the availability of samples with subsequent distribution by sex and age categories. The age of wild boar was estimated according to the criteria given by WAGENKNECHT (1984), with subsequent classification into three categories, piglets, yearlings and boar (from two years of age and older). In this way, the possibility of error in the classification of pigs by age is reduced compared to regular categorization into offsprings, yearlings, boar (ANONIMUS, 2006).

Immediately after wild boar were shot, blood, spleen, cranial lobe of the lung and olfactory bulb were sampled directly in the field. Blood samples (3-5 ml) were sampled with a syringe and needle directly from the heart of a wild boar, and in cases where there was no blood in the heart, it was taken from large blood vessels, directly or after decapitation. The sample of the spleen and the front part of the lung were sampled "in situ", measuring about 5x5x5 cm. Samples of olfactory bulbs were sampled in such a way that the skull bones were cut with three incisions. The collected blood samples

were screened by an enzyme-linked immunosorbent assay for the presence of antibodies to gpl protein of Aujeszky's disease virus in wild boar serum to determine seroprevalence. At the same time, in samples of the spleen, anterior lobes of the lungs and olfactory bulbs, in which longer virus retention is expected, a polymerase chain reaction test for viral DNA was performed. This study was cross-sectional, performed at a certain time, excluding the time component from research. Sampling is random and the size of the population according to each hunting ground is determined on the basis of data from the Central Hunting Records, which primarily for this work include data on breeding stock and hunting and hunting productive area for wild boar. From the obtained data, the prevalence and prevalence of the appearance ratio of positive versus negative herds were determined. Differences in the incidence of Aujeszky's disease between the sexes were examined by Fisher's exact test (ZAR, 1999), χ^2 test by McNemar χ^2 test. The software tool Akaike Information Criterion (AICc BURNHAM and ANDERSON, 2002) was used in the analysis and selection of the model. Logistic stepwise regression was used to calculate the prediction of Aujeszky's disease virus infection ELISA AB gpl IDEXX (1 = negative ELISA AB gpl IDEXX finding or 0 = positive ELISA AB gpl IDEXX finding) (HOSMER and LEMESHOF, 2000). A log probability ratio test was used to determine the statistical significance of each model. The significance of the coefficients of the dependent variables (predictors) is based on χ^2 Wald statistics (Wald's χ^2).

RESULTS: Samples of olfactory bulbs, spleen or cranial lung were not positive by PCR screening for Aujeszky's disease virus, while the overall prevalence of 33.78% of serologically positive wild boar for Aujeszky's disease virus. According to gender, the prevalence in males is 25.26% and in females 40.15%. The odds ratio in this case is 1.9852, which indicates that females are 1.9 times more likely to be positive than

males. Additionally, the sex classes were broken down into age categories, so a seroprevalence in piglets of 10%, in the category of boar from 1 to 2 years 27.53%, and in boar older than two years 65.75% was determined. Statistically significant values in yearlings and boar in the second year are three times more likely to be positive for females, while in the category of piglets and boar older than two years, the values are not statistically significant. The obtained results observed by the McNemar χ^2 test indicate that at the level of the compared individuals there is a statistically significant identity between the expected frequencies of negative boars and positive sows. Examination of differences between age classes within each sex showed far greater statistically significant differences between groups, so that boars are significantly more often positive than yearlings, while sows are more often positive than yearlings and piglets. Tests have shown that in both sexes the frequency of positive piglets does not affect the frequency of positive yearlings, while in all other combinations the frequencies show correlation. Observed according to the location of sampling by comparing positive and negative heads in the area of Zagreb and Sisak-Moslavina counties and in the area of Osijek-Baranja and Sisak-Moslavina counties, a statistically significant difference was obtained. According to the criterion of $\Delta AIC < 2$ units, 21 models of assessment (prediction) of Aujeszky's disease virus infection were singled out. With the proposed models, it is possible to estimate an infected or uninfected animal with an average accuracy of 77.12 to 78.67%. The accuracy of the assessment of positive individuals is about 10% lower than the accuracy of the assessment of negative individuals and ranges from 70.15% (model 14) to 74.63% (models 5, 6 and 8). On the other hand, the accuracy of estimating negative individuals ranges from 82.46% (models 5, 6, and 8) to 85.09% (models 4, 7, 9, and 15). Models that estimate positive wild boar positive individuals (5, 6, and 8) at the same time are

less accurate in estimating negative individuals. 12 predictors were used in the development of 21 models. They can be divided into population predictors (age classes, sex, population density and relative hunting quota), hunting technique predictors (hunting technique) and habitat predictors (altitude and share of individual land use categories). The most common predictors are age classes, which are included in all models. In second place is the population density, which is not included only in model 12, but it is also a model that gives low accuracy of estimation of positive (71.64%) and negative heads (83.33%), ie in general it is a model with the lowest reliability ($-2LL = 170.73$). Gender predictors and relative culling quota occur relatively rarely in the model. The signs of the coefficients obtained by logit regression indicate the final value of the dependent variable. The age class coefficient has a positive sign, while the coefficients of grassland share, arable land share and population density have a negative sign. This indicates that with increasing age of the individual, the probability that the individual in the population will be positive for Aujeszky's disease increases. On the other hand, the smaller the proportion of grassland and arable land and the lower the density of the feral pig population, the more likely it is that individuals in the population will be negative for Aujeszky's disease.

DISCUSSION AND CONCLUSION: Determined average seroprevalence was 33.78% which is consistent with the findings from Slovenia and Spain. The prevalence increases with the age, being almost identical in females and males. Furthermore, the prevalence is influenced by geographical location and type of breeding. The statistically significant difference was determined in prevalence between Sisačko-moslavačka County and Zagrebačka or Osječko-baranjska County. Animals kept in fenced breeding have higher prevalence compared to free-living ones. According to obtained data it can be concluded that majority of infections in wild boar are latent ones.

However, increased stress during mating season and collective hunting are potential triggers for virus activation and consequent transmission to other individuals. Therefore, and based on detected seroprevalence, the role of boars in virus transmission is highly emphasized. The applied models indicate that decreasing population size results in decreasing prevalence, on the other hand increasing population size does not result in proportional increase in prevalence. Higher ration of forest stands is related to higher prevalence, probably due to the higher habitat quality and consequently larger wild boar population. PCR analysis did not confirm presence of the virus.

1. Uvod

Euroazijska divlja svinja proširena je u Europi i Aziji te manjim dijelom u Africi i Sjevernoj Americi. U većem dijelu Europe, kao i u Republici Hrvatskoj, brojnost populacije ove divljači u stalnom je porastu posljednjih godina. Izuzetak trenutno predstavlja sam istok Europe gdje je lokalno došlo do značajnoga pada brojnosti uslijed pojave afričke svinjske kuge. S druge strane, u ostalim dijelovima Europe, divlje svinje dolaze sve bliže naseljima, pa se čak i nalaze u pojedinim većim gradovima. Ova je činjenica od iznimne važnosti s obzirom na to da je divlja svinja potencijalni rezervoar brojnih virusnih i bakterijskih bolesti prenosivih, ne samo na domaće svinje, već i na druge domaće životinje, ali i čovjeka. Upravo je u posljednje vrijeme afrička svinjska kuga u fokus istraživanja stavila epidemiologiju te bolesti u divljih svinja, primarno zbog potencijalnog širenja na domaće svinje i nesagledivih šteta koje zbog toga mogu nastati u svinjogojskoj proizvodnji. U ovom istraživanju naglasak je na bolesti Aujeszzkoga. Ova bolest može nanijeti velike ekonomske štete u uzgojima domaćih svinja te se stoga kontrolira preventivnim cijepljenjem i *stamping out* metodom. Kako je bolest enzootskog obilježja u divljih svinja (RUIZ-FONS, 2017.), ona predstavlja neprekidnu prijetnju uzgojima domaćih svinja. S druge strane, treba istaknuti i rizik za populaciju lovačkih pasa koji nerijetko dolaze u kontakt s virusom tijekom redovnih lovnih aktivnosti ili putem hranjena sa sirovim mesom i iznutricama odstreljenih divljih svinja. U Hrvatskoj je dokazan međuvrtni prijenos virusa, te su sojevi virusa izdvojeni iz domaćih, divljih svinja i pasa genetski visoko podudarni (KEROS i sur., 2015.).

Kako su dosadašnja istraživanja uglavnom bila usmjerena na seroprevalenciju, u ovome je radu provedena usporedba serološkoga nalaza i dokazivanja virusa molekularnim metodama na uzorcima podrijetlom od istih divljih svinja. Također, provedena je i usporedba demografskih pokazatelja populacije s dobivenim rezultatima pretraga, kao i usporedba nalaza s značajkama okolišnih čimbenika, posebice u svjetlu različitih bonitetnih razreda, ukupnih površina lovišta te lovnoproduktivnih površina. Na ovaj se način pokušalo utvrditi koji nas pokazatelji mogu uputiti na povećani rizik od pojave ove bolesti u populaciji divljih svinja. Konačno, kako divlje svinje imaju složenu društvenu strukturu bilo je neophodno uvrstiti i te čimbenike u razmatranje.

2. Pregled dosadašnjih spoznaja

2.1. Divlja svinja (*Sus scrofa* L.)

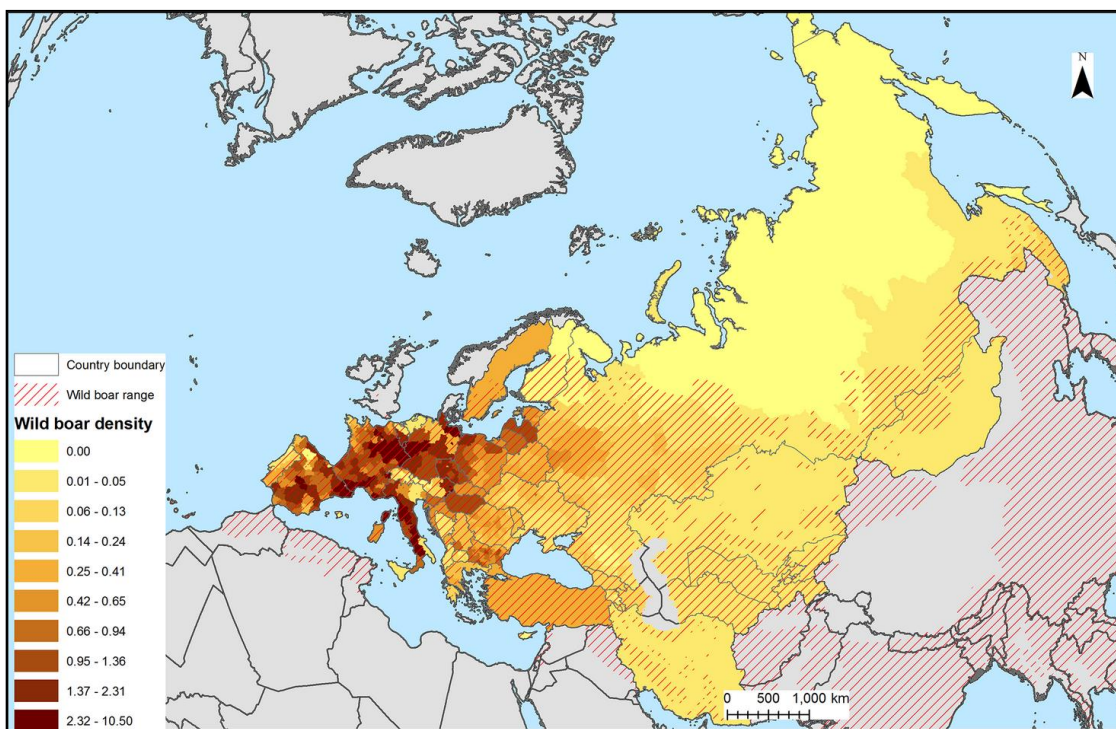
Sve divlje svinje na europskom kontinentu pripadaju samo jednoj vrsti, euroazijskoj divljoj svinji (*Sus scrofa* L.). Prema znanstvenom razvrstavanju euroazijska divlja svinja pripada u koljeno – kralješnjaci (*Chordata*), razred – sisavci (*Mammalia*), nadred *Laurasiatheria*, red – parnoprstasi (*Cetartiodactyla*), porodica – svinje (*Suidae*) (HU i sur., 2012.). Unutar ove vrste poznato je više podvrsta, pri čemu se taj broj razlikuje, ovisno o literaturi. Prema glavnini izvora podataka, u Europi ih živi sedam i to: srednjoeuropska divlja svinja (*Sus scrofa* L.), iberijska divlja svinja (*Sus scrofa castilianus*), sardinijska divlja svinja (*Sus scrofa meridionalis*), talijanska divlja svinja (*Sus scrofa majori*), poljska divlja svinja (*Sus scrofa falzfeini*), jugoistočna europska divlja svinja (*Sus scrofa attila*) i jugoslavenska divlja svinja (*Sus scrofa reiseri*) (JANICKI i sur., 2007.). Ukupno gledano, euroazijska divlja svinja nastanjuje područje Europe i Azije te dio sjeverne Afrike i ponešto Sjeverne Amerike.

2.1.1. Povijesni pregled, rasprostranjenost i brojno stanje u Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj, divlja svinja prisutna je u svim njenim predjelima izuzev određenih jadranskih otoka. Tijekom zadnjeg glacialnog maksimuma Balkanski je poluotok, uslijed povoljnijih klimatskih prilika poslužio kao važno utočište (refugij) za preživljavanje divlje svinje (HEWITT, 1999., 2000.). Iz njega se ova vrsta naknadno, dolaskom povoljnijih klimatskih uvjeta i uz određeni učinak s istoka, ponovno proširila ostatkom kontinenta. Genotip divlje svinje na ovim područjima očuvan je do danas uz ograničeni učinak hibridizacije na

genetsku strukturu (ALEXANDRI i sur., 2012.). U razdoblju, odmah nakon Drugoga svjetskoga rata, na području Republike Hrvatske, brojnost se procjenjivala na svega 300 jedinki (DARABUŠ I JAKELIĆ, 1996.), a razlog su tako maloj populaciji ratna stradavanja, velika brojnost grabežljivaca i prisutnost virusa klasične svinjske kuge s kojim su lako dolazile u susret zbog visokog udjela ekstenzivnoga držanja domaćih svinja, posebice u vidu tradicionalnoga pašarenja i žirenja. U Hrvatskoj je primjerice sredinom devedesetih godina, prema nekim autorima, uslijed križanja s domaćom svinjom izmijenjen izvorni fenotip divlje svinje, ali se je pri tome i povećao broj prasadi u leglu po pojedinoj krmači (TONČIĆ i sur., 2006.). Iako je neupitno da određena križanja divljih i domaćih svinja postoje (ŠPREM i sur., 2014), ona su još uvijek dosta kontroverzno područje i vjerojatno se ne radi o većem postotku introgresije gena domaćih svinja u populaciju divljih (SCANDURA i sur., 2011.), barem ne na većem dijelu Republike Hrvatske.

U svakom slučaju, populacija divljih je svinja, ne samo u Hrvatskoj, već i u ostatku Europe, u stalnom porastu nakon Drugoga svjetskoga rata (SÁEZ-ROYUELA i TELLERÍA, 1986.).



Slika 1. Gustoća divljih svinja po administrativnim jedinicama po km² u 2018. godini i područja koja nastanjuju divlje svinje (Izvor: Organizacija za poljoprivredu i hranu, FAO, PITTIGLIO i sur., 2018.)

Takvom porastu populacije svakako doprinose određeni biološki čimbenici kao što su smanjenje broja grabežljivaca, iskorjenjivanje bolesti poput klasične svinjske kuge, prekomjerna prihrana, pošumljavanje, intenziviranje ratarstva s porastom površina pod kukuruzom, blage zime te popularizacija lova kao i uzgoja divlje svinje (GENOV i sur., 1981., ERKINARO i sur., 1982., GEISSER i sur. 2005., GETHÖFFER i sur., 2007., CELLINA i sur., 2008., FONSECA i sur., 2011., BOROWIK i sur., 2013., JERINA i sur., 2014). Prema službenim evidencijama, brojno stanje divlje svinje u Republici Hrvatskoj koleba od 30 000 do 60 000 grla, dok se odstrel unatrag nekoliko godina kreće od 29 500 do 30 000 grla na godišnjoj razini (ANONIMUS, 2018.). Na određenim područjima Hrvatske (poput kvarnerskih otoka, Krka i Cresa) zbog navodnih šteta u

ovčarstvu, ali i onih na vinovoj lozi i općenito ratarstvu, divlja svinja je nepoželjna, te se provodi neselektivni odstrel s ciljem njenog potpunog iskorjenjivanja.

O trendu rasta populacije divljih svinja, kao i o činjenici da je odstrel dugo vremena provođen u nižem udjelu negoli je to zaista trebalo biti, govori i podatak da je u 18 europskih država (Austrija, Belgija, Hrvatska, Češka, Francuska, Njemačka, Mađarska, Italija, Latvija, Luksemburg, Poljska, Portugal, Rusija, Srbija, Slovenija, Španjolska, Švedska i Švicarska) prema službenim evidencijama 1992. godine odstrijeljeno je 864 000 divljih svinja, dok je dvadeset godina kasnije u istim državama zabilježen odstrel od 2,2 milijuna divljih svinja. U istom razdoblju, broj lovaca u navedenim je državama ostao isti ili se čak smanjivao, a upravo su oni glavni čimbenik smanjenja brojnog stanja divljih svinja (MASSEI i sur., 2014.).

2.1.2. Izgled, građa tijela i razmnožavanje

Divlja svinja ima krupno tijelo, prekriveno dlačnim pokrovom i to gustom poddlakom (malje) te grubom pokrovnom dlakom – čekinjama, koje mogu biti smeđecrvene pa sve do sive ili crne boje, ovisno o dobi jedinke, godišnjem dobu i podneblju u kojem obitava. Mladunčad je smeđe boje s tamnim prugama koje se gube prvim linjanjem. Ovakva obojenost dlačnog pokrova naziva se livreja (JANICKI i sur., 2007.). Visina u grebenu može biti do 110 cm, a dužina od vrha njuške do repa i do 155 cm (DARABUŠ i JAKELIĆ, 1996.). Tjelesna masa kreće se obično oko 150 kg (krmače), ali može dosegnuti kod veprova i više od 200 kg (JANICKI i sur., 2007.). Njuška (rilo) je izdužena i mišićava te omogućava dugotrajno rovanje i potragu za hranom. Glavna su značajka mužjaka kljove

(očnjaci) i slin (potkožno vezivno-tkivno zadebljanje u području plećke), dok su kod ženke to klice (očnjaci). Od osjetila najviše se oslanjaju na istančan njuh, dok su sluh i vid manje razvijeni.

Spolnu zrelost ženke postižu u dobi od 18 do 20 mjeseci, a mužjaci u dobi od 8 do 12 mjeseci. Parenje divljih svinja zbiva se obično u studenom i prosincu



Slika 2. Primjerci odraslih divljih svinja (Autor: Ivica Sućec)

i naziva se bucanje, no zbog globalnih utjecaja, narušene dobne strukture i obilja hrane u određenim područjima, razdoblje parenja prošireno je i na druge mjesece u godini. U vrijeme

bucanja veprovi prilaze krdima te nameću svoju dominaciju nad krdom i odbijaju ostale mlađe mužjake obilježavanjem teritorija slinom i mokraćom, a ponekad i borbom. Bređost krmača obično traje oko 117 dana, a krmače oprase do 12 prasadi, koja ostaje na sisi do dobi od 3 do 4 mjeseca, a sa šest mjeseci se osamostale (JANICKI i sur., 2007.).

2.1.3. Prehrana

U današnjim uvjetima života glavina prehrane divlje svinje odvija se noću. S obzirom na to da je svinja svejed, prehrana se sastoji od žitarica, šumskih plodova, voća, gomolja, ličinki, kukaca, vodozemaca, mekušaca, riba i drugoga. Unatoč činjenici da su svejedi, divlje svinje prioritet ipak daju hrani biljnoga podrijetla (CELLINA i sur., 2008.). Podneblje i godišnje doba uvelike utječu na prvi odabir prirodne hrane, a svakako se može izdvojiti žir, bukvice, trava, korijenje, voće te gujavice i kukci kao značajniji dijelovi prehrane divljih svinja. Nerijetko, svinje će konzumirati i strvine te ostatke hrane koju konzumiraju ljudi, ako im je lako dostupna. Uz prirodne izvore hrane, velik utjecaj u ishrani imaju i ratarske kulture (prije svega kukuruz, pšenica, zob). U razdobljima izobilja, unatoč oportunističkomu, prilikom ishrane divlje svinje birat će hranu koja im više odgovara. Primjerice, u jesen će svakako birati plodove žira i bukvice, dok je kukuruz u to vrijeme manje zastupljen u ishrani. Dohrana svinja u posljednje vrijeme ima znatnu ulogu u njenim prehranbenim navikama. Naime, dohrana (prihrana) je u Hrvatskoj i u zemljama u okruženju zakonita, te se provodi u svrhu odvratanja od ratarskih kultura (sprječavanje šteta), primame u svrhu lova, fotolova, uzorkovanja i istraživanja, povećanja populacije i zaštite uslijed teških vremenskih prilika (duboki snijeg) (CELLINA i sur., 2008.). Izvor i količina dostupne hrane uvelike utječu na migracije svinja, spolnu zrelost, veličinu krda i brojnost prasadi, a neposredno i na epidemiološke prilike u populaciji.



Slika 3. Krdo divljih svinja na hrani noću (Autor: Ivica Sućec)

2.1.4. Stanište, način života i ponašanje divljih svinja

Divlja svinja daje prednost šumi i močvarnim/plavnim područjima, ali s obzirom na to da je izuzetno prilagodljiva, može se pronaći i u svim drugim tipovima staništa (otvorenim područjima, otocima, gorju). Tijekom dana odmaraju se u gustom vegetaciji (bujad, čivitnjača, glog, divlja kupina, makija – ovisno o podneblju), ili u ratarskim kulturama koje im osiguravaju zaklon. No izuzev prirodnoga staništa, zabilježen je svojevrsan gubitak straha od ljudi, pa je tako u velikim gradovima sve češće zabilježena prisutnost divljih svinja u gradskim

četvrtima. Divlja svinja zabilježena je i u urbanim sredinama poput Barcelone i Berlina (CAHILL i sur., 2003., JANSEN i sur., 2007.). Ni Republika Hrvatska nije izuzetak od ovoga trenda, pa se primjerice divlje svinje mogu vidjeti u Markuševcu, Šestinama ili Čučerju. Kaže se da je divlja svinja pokazala znatnu intraspecifičnu bihevioralnu plastičnost prikladnu za prilagodbu okolišu u kojem dominiraju ljudi (STILLFRIED i sur., 2017.).

U lovačkoj se terminologiji mužjaka naziva vepar, ženku krmača, mladunčad prasad, a godišnjake nazimad. Svinje su iznimno društvene životinje, osim veprova koji sa dvije godine napuštaju krdo i žive samotnjački. Krdo predvodi stara krmača, a sastoji se od više krmača, nazimadi i prasadi (JANICKI i sur., 2007.).

2.1.5. Bolesti divljih svinja

Divlje svinje obolijevaju od istih bolesti kao i domaće svinje pa je potrebno izdvojiti neke od najčešćih oboljenja poput bruceloze, klasične svinjske kuge, afričke svinjske kuge, trihineloze, hepatitisa E, bolesti Aujeszzkoga, parvovirusne infekcije, cirkovirusne infekcije svinja tipa 2, reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (JEMERŠIĆ i sur., 2019.). Od navedenih bolesti važno je napomenuti kako je divlja svinja mogućerizervoar brojnih virusnih infekcija poput reproduktivnoga i respiratornoga sindroma u svinja, cirkovirusne infekcije svinja tipa 2 te parvovirusne infekcije (ROIĆ i sur., 2005., 2006., 2012.).

U svrhu utvrđivanja epidemiološke i epizootiološke uloge divljih svinja provedeno je istraživanje na području kontinentalne Hrvatske u razdoblju od 2005. do 2009. godine. Utvrđene su serološki pozitivne jedinice na klasičnu

svinjsku kugu, bolest Aujeszzkoga, leptospirozu divljih svinja, brucelozu divljih svinja, kompleks mikobakterija (*M. avium*, *M. avium hominissuis*, *M. fortuitum*, *M. caprae* i *M. peregrinum*) i parvovirozu divljih svinja (SLAVICA i sur., 2011.). Iz navedenih rezultata, razvidno je kako divlja svinja može imati ulogu u širenju različitih oboljenja, od kojih su neka i zoonoze te da predstavlja potencijalni rizik za zdravlje domaćih i divljih svinja, a u nekim situacijama i na ljudsko zdravlje. U epidemiološkom smislu poseban značaj ima činjenica da je divlja svinja društvena životinja, s izuzetkom odraslih mužjaka, te da živi u skupinama (krdima) koje čine zrele ženke i njihov podmladak. U takvim životnim uvjetima, uz današnju rasprostranjenost i brojno stanje, raste i uloga divlje svinje kao rezervoara niza različitih uzročnika bolesti (ACEVEDO i sur., 2007.).

2.2. Bolest Aujeszškoga

2.2.1. Povijest i nazivlje bolesti Aujeszškoga

Bolest Aujeszškoga ili lažna bjesnoća (*pseudorabies*) akutna je virusna infekcija domaćih i divljih životinja. Ova se bolest prvi puta spominje u Sjedinjenim Američkim Državama 1813. godine pod nazivom *Mad Itch* (ludi svrbež), a u Europi 1889. godine u Švicarskoj. Prvi zapis u Hrvatskoj datira iz 1904. godine (CVETNIĆ, 1997.).

2.2.2. Etiologija

Virus bolesti Aujeszškoga svinjski je herpesvirus 1 (*Suid herpesvirus-1* ili SuHV-1). To je DNK virus koji pripada porodici Herpesviridae, potporodici *Alphaherpesvirinae* i rodu *Varicellovirus*. Molekularnim analizama utvrđeno je da je virus bolesti Aujeszškoga u najbližoj vezi s herpesvirusom goveda 1 (BHV-1), herpesvirusom konja 1 (EHV-1) i varicela-zoster virusom (VZV) (McGEOCH i sur., 1994.). Izolati virusa bolesti Aujeszškoga u domaće i divlje svinje genetski su identični te ukazuju na cirkulaciju najmanje jednog soja virusa u te dvije populacije svinja (KEROS i sur., 2015.).

Virion se sastoji od nukleoproteinske jezgre koja sadrži genom, ikozaedralne kapside sa 162 kapsomere, proteinske matrice (tegument) i lipidne ovojnice s glikoproteinima. Genom se sastoji od dvostruke DNK ovojnice, veličine do 150 nm (METTENLEITER, 2000.). Kapsida je oformljena od proteina u modularnoj strukturi koji su proteolitički odvojeni, dok matrica još uvijek nije dovoljno istražena. Što se tiče ovojnice, do sada je opisano 11 glikoproteina virusa (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gN), od kojih su svi sastavni dio

fosfolipidne ovojnice osim gG koji se obilno proizvodi prilikom infekcije. Ovi glikoproteini imaju ključnu ulogu u nastanku bolesti i pojavi imunosti, a uz neke gene i u slabljenju virusa bolesti Aujeszzkoga (METTENLEITER, 2000.).

Virus je otporan na niske temperature koje ga konzerviraju na više tjedana, dok se pri temperaturi od 4°C održi 4 tjedna, na temperaturi od 37°C gubi virulenciju za 28 dana, a na temperaturi od 50°C inaktivira se za 1 sat (CVETNIĆ, 1997.). Navedene činjenice ukazuju na to da se virus lako održava u okolišu koji može poslužiti kao stalni izvor zaraze što potvrđuje i činjenica da je zabilježen prijenos zrakom između Njemačke i Danske u područjima velike gustoće svinja (CHRISTIANSEN i sur., 1990.,1993.). Također, važno je napomenuti da ga ultraljubičaste zrake brzo inaktiviraju kao i pH niži od 6 te viši od 11.

Virus bolesti Aujeszzkoga koristi se kao testni virus prilikom istraživanja novih cjepiva. Pored toga, imunosni odgovor na infekciju ili vakcinaciju ovim virusom otkrio je važne informacije o imunosnom sustavu svinja (ZUCKERMANN, 2000.). Ukupno su dokazana četiri glavna genotipa virusa bolesti Aujeszzkoga u divljih svinja, od kojih je Tip I pronađen u SAD-u i centralnoj Europi, Tip II i Tip III u centralnoj i sjevernoj Europi, a tip IV u Aziji (MÜLLER i sur., 2011.).

Virus ima tropizam na respiratorni i živčani sustav, umnaža se u organizmu velikog broja životinja, uključujući gotovo sve sisavce, koji služe kao krajnji domaćin (METTENLEITER, 2000.). Ono što je posebno važno za navesti jest to da je svinja jedini domaćin koji može preživjeti infekciju i poslužiti kao rezervoar virusa. Infekcija ovim virusom, kao i u slučaju drugih herpesvirusa, može dovesti do trajne infekcije u svinja (METTENLEITER i sur., 2012.), odnosno do virusne

latencije (WIDEN i sur., 2012.), koja se uglavnom uspostavlja u stanicama trigeminalnoga i sakralnih ganglija (ROMERO i sur. 2003., METTENLEITER i sur., 2012.). To nam govori kako su upravo stanice neurona središnjega živčanoga sustava mjesta latentne infekcije ovim virusom (BROWN i sur., 1995.). Uslijed djelovanja određenih stresora, latentni virus može se ponovno aktivirati u tonzilama i drugim tkivima (WITTMANN i sur., 1983., METTENLEITER i sur., 2012.).

2.2.3. Epizootiologija bolesti Aujeszzkoga

Bolest se javlja uglavnom kod svinja, a u drugih vrsta sporadično. U domaćih svinja uglavnom se prenosi kapljičnom infekcijom, prvenstveno zbog gustoće svinja na farmi (PACINI i sur., 2020.), a virus se u svinjama zadržava do 6 mjeseci nakon preboljenja. Ako su inficirane krmače, one mogu mlijekom i dijaplacentarno širiti virus. Divlje svinje uglavnom prenose virus spolnim putem i to u vrijeme parenja (ROMERO I sur., 2001.), iako ne treba zanemariti kapljični prijenos unutar krda tijekom godine (krmača – prasad i nazimad). Virus se može naći i u plućima zdravih životinja, kod kojih se nakon pada imuniteta naglo razmnožava te mu raste virulencija. Ova pojava dakako otežava pronalazak izvora infekcije (CVETNIĆ, 1997.). PACINI i sur. (2020.) izolirali su virus u plodu seropozitivne divlje svinje u endemskom području Italije što upućuje na moguće nove načine prijenosa virusa i ulogu virusa na bređost divljih svinja.

Mogući načini prijenosa virusa su koitusom, intrauterino, galaktogeno te preko ozlijeđene kože, a važno je napomenuti kako širenju virusa potencijalno doprinose mesojedi koji mogu razvlačenjem lešina virus širiti dalje. Mesojedi se

zaraze a uglavnom peroralno i to uzimanjem sirovoga svinjskoga mesa i iznutrica svinja.

Virus se početno umnaža u nazofarinksu i prisutan je u nosnom iscjetku prvih desetak dana po infekciji. Limfom virus prodire do limfnih čvorova ždrijela i nosa, odakle živcima dopijeva u pons i medulu. S druge strane, olfaktornim živcima virus dolazi do njušnih lukovica. Nakon prodora u središnji živčani sustav širi se naglo pa se može naći u lumbalnim i sakralnim segmentima leđne moždine.

Svinja je jedini domaćin koji može preživjeti infekciju i poslužiti kao rezervoar virusa. Infekcija ovim virusom, kao i u slučaju drugih herpesvirusa, može dovesti do trajne infekcije u svinja (METTENLEITER i sur., 2012.), odnosno do virusne latencije (WIDEN i sur., 2012.) koja se uglavnom uspostavlja u stanicama trigeminalnoga i sakralnih ganglija (ROMERO i sur. 2003., METTENLEITER i sur., 2012.). To nam govori kako su upravo stanice neurona središnjega živčanoga sustava mjesta latentne infekcije ovim virusom (BROWN i sur., 1995.). Uslijed djelovanja određenih stresora, latentni virus može se ponovno aktivirati u tonzilama i drugim tkivima (WITTMANN i sur., 1983., METTENLEITER i sur., 2012.).

Parenje i stres u lovu bitni su pokretači prijenosa patogena (ROSSI i sur., 2005., VICENTE i sur., 2005.). Ove eko-epidemiološke premise podupiru terenska promatranja, što sugerira da se virus bolesti Aujeszzkoga uglavnom prenosi u ovo doba godine (VICENTE i sur., 2005., GONZÁLEZ-BARRIO i sur., 2015.).

2.2.4. Klinička slika u domaćih svinja, divljih svinja i pasa

Inkubacija bolesti traje od 1 do 6, a ponekad i do 10 dana (CVETNIĆ, 1997.). Kod svinja klinički znakovi prije svega ovise o dobi životinje, zdravstvenom statusu, soju i dozi virusa (POMERANZ i sur., 2005., METTENLEITER i sur., 2012.), a javljanju se simptomi na respiratornom, reproduktivnom i središnjem živčanom sustavu. (PEJSAK i sur., 2006.). U prasadi se javlja akutna septikemija, drhtanje, paraliza stražnjih nogu i drugi znakovi poremećaja središnjega živčanoga sustava. U krdima koja nisu bila u kontaktu s virusom može doći i do visoke smrtnosti od čak 95 %, dok je u krdima koja su ranije bila u kontaktu s virusom smrtnost znatno niža i iznosi do 2,5 % (CVETNIĆ, 1997.). U starijim dobnim skupinama, slični su znakovi bolesti, ali se pojavljuju i respiratorni znakovi, a smrtnost je niža. U krmača se bolest očituje pobačajem ili rađanjem slabe prasadi. WITTMANN (1986.) je utvrdio stopu smrtnosti do 100 % u prasadi mlađe od 2 tjedna, a oko 50 % u prasadi stare tri tjedna, dok je u zrelih jedinki zabilježena smrtnost manja od 5 %.

U starijim dobnim kategorijama domaćih svinja bolest Aujeszzkoga respiratorna je bolest, rijetko sa znakovima poremećaja središnjega živčanoga sustava, a inficirane životinje oporavljaju se za 10-ak dana ako nije došlo do sekundarnih infekcija. U divljih svinja zaraza uglavnom prolazi asimptomatski, no Gortazar i sur. (2002.) evidentirali su poremećaje središnjega živčanoga sustava s niskom stopom smrtnosti (14 % smrtnost kod mlađih i 7 % kod odraslih jedinki) u istraživanjima provedenima u Španjolskoj, dok su u Njemačkoj Schulze i sur. (2010.) zabilježili kliničke znakove samo u mlađih jedinki. Eksperimentalno su

potvrđeni različiti klinički znakovi u divljih svinja koji su u korelaciji sa sojem i dozom virusa (MÜLLER i sur., 2001.).

U pasa inkubacija može trajati do 10 dana, nakon čega temperatura naglo poraste, a od ostalih kliničkih znakova može se javiti depresija, strah, dispneja, reakcija i na najmanje podražaje, samoozljeđivanje, prekomjerno slinjenje i agresivnost (MONROE, 1989., CVETNIĆ, 1997., SCHÖNIGER i sur., 2012.). Bolest uglavnom završava smrtno kod većine pasa i to unutar četiri dana od pojave kliničkih znakova. Bolest traje od svega 6 sati pa do 96 sati (MONROE, 1989.).

2.2.5. Dijagnostika

Virus bolesti Aujeszzkoga može se u živih svinja potvrditi brisom nosa i tonzila te u orofaringealnoj tekućini. Postmortalnim pregledom moguće ga je potvrditi i u perifernim organima kao primjerice u mozgu, slezeni i plućima. Kod domaćih svinja koje su latentno zaražene, virus se može potvrditi u trigeminalnim ganglijima, dok ga je kod divljih svinja moguće potvrditi i u sakralnim ganglijima.

Testovi lančane reakcije polimerazom (PCR) koriste se u svrhu dokazivanja prisutnosti virusa ili virusnoga genoma, dok se serološki testovi uglavnom koriste za dijagnozu latentnih infekcija i nakon nestanka kliničkih znakova. Serološki se testovi mogu koristiti samo kod svinja jer je kod drugih životinja tijekom bolesti brz i uginuća nastupaju prebrzo da bi se proizvela protutijela.

Dijagnostičke metode koje se koriste u svrhu dokazivanja uzročnika bolesti Aujeszzkoga su izolacija virusa i lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR), dok se za utvrđivanje imunosnog odgovora koriste lateks aglutinacija, imunoenzimski test (ELISA) i virus neutralizacijski test. (OIE, 2018.)

2.2.6. Profilaksa i liječenje

Bolest Aujeszzkoga može rezultirati trgovinskim ograničenjima, kao i znatnim ekonomskim gubicima, posebice u zemljama gdje se javlja u endemskom obliku. Programi iskorjenjivanja mogu uspješno držati ovu bolest pod kontrolom, no virus se i dalje održava u populaciji divljih svinja te na taj način predstavlja stalnu prijetnju za populaciju domaćih svinja, a povremeno može uzrokovati i bolest u drugih životinja, poput primjerice lovačkih pasa.

Preventivne mjere i mjere kontrole bolesti odnose se na mjere kontrole životinja prije stavljanja u promet ili uvođenja u stado, mjere biosigurnosti, karantene, cijepljenja, „stamping out“ metode u slučaju pojave zaraze u krdu, a odabir odgovarajućih mjera ovisi o veličini krda, epidemiološkoj situaciji, zdravstvenom statusu određene regije ili države te ujedno i strategiji kontrole bolesti Aujeszzkoga koja može biti različita od države do države. Trenutno su dostupne atenuirane, inaktivirane i marker vakcine, koje igraju važnu ulogu u kontroli bolesti, ali ipak ne osiguravaju 100-postotni imunitet, posebice kod latentnih infekcija.

U slučaju pasa i ostalih prijemljivih životinja, prevencija se svodi na sprječavanje hranjenja sirovim mesom i iznutricama od domaćih svinja ili divljih svinja te onemogućavanje kontakta sa svinjama nepoznatoga zdravstvenoga statusa zato što vakcina ne postoji. Potonje je poseban problem u slučaju lovačkih pasa koji imaju navadu griženja i jedenja odstrijeljenih svinja još tijekom lova.

2.3. Seroprevalencija i izolacija virusa iz divljih svinja u državama Europe

Europske zemlje imaju vrlo različite podatke o seroprevalenciji bolesti Aujeszškoga u populaciji divljih svinja, a istraživanja pokazuju da je ovaj virus široko rasprostranjen. Iz dostupnih podataka razvidno je da seroprevalencija znatno varira među različitim regijama Europe, a također i unutar samih područja niske seroprevalencije utvrđena su područja koja imaju umjerenu ili nisku seroprevalenciju virusa bolesti Aujeszškoga (MEIER i sur., 2015.). Tako, prema dostupnim podacima visoka seroprevalencija virusa bolesti Aujeszškoga utvrđena je u divljih svinja na području mediteranskih zemalja i to prije svega u Španjolskoj (0,8 – 44 %, pa i do 100 %), (VINCENTE i sur., 2002., VINCENTE i sur., 2005., RUIZ-FONS i sur., 2006., RUIZ-FONS i sur., 2007., CLOSA-SEBASTIA i sur., 2011., BOADELLA i sur., 2012., CANO-MANUEL i sur., 2014.), Italiji (30 – 51 %), (LARI i sur., 2006., MONTAGNARO i sur., 2010.), Francuskoj (3,5 – 54 %), (ALBINA i sur., 2000., ROSSI i sur. 2008.), kao i u srednjoeuropskim i istočnoeuropskim zemljama poput Slovenije (31 %) (VENGUŠT i sur., 2005., VENGUŠT i sur., 2006.), Austrije (38 %) (STEINRIGL i sur., 2012.), Češke (30 %) (SEDLAK i sur., 2008.), Rumunjske (55 %) (VUTA i sur., 2009.) i Poljske (32,2 %) (LIPOWSKI i sur., 2017.). Za razliku od njih, u srednjoeuropskim i sjevernoeuropskim zemljama poput Švicarske (0.57 – 4 %) (KÖPPEL i sur., 2007., LEUENBERGER i sur. 2007., MEIER i sur., 2015.), Nizozemske (0 %) (DEKKERS i sur., 2000., ELBERS i sur., 2000., ELBERS i sur., 2001.) i Švedske (0 %) (LINDBERG, 2018.) utvrđena umjerena do niska seroprevalencija. Na području Republike Hrvatske u dosadašnjim istraživanjima utvrđena je visoka

seroprevalencija od 54,54 % na području Moslavačke gore (ŽUPANČIĆ i sur., 2002.) te 38,5 % na 4 lokaliteta kontinentalnoga staništa divlje svinje (ROIĆ i sur., 2012.). Pored toga, uspješno je izoliran i virus (JEMERŠIĆ i sur., 2012., KEROS i sur., 2014.). Visoka seroprevalencija u određenim europskim zemljama predstavlja rizik za daljnje širenje bolesti Aujeszzkoga u populaciji divljih svinja, ali i domaćih svinja, unatoč naporima za iskorjenjivanje ove bolesti. Rasponi seroprevalencije u određenim državama, prije svega u Francuskoj, Španjolskoj, Italiji i Hrvatskoj ukazuju na heterogenost unutar različitih staništa i populacijskih značajki divlje svinje. Značajke infekcije virusom bolesti Aujeszzkoga u divljih svinja istraživane su u više zemalja, te su dokazani neujednačeni rezultati u kliničkim znakovima i pomoru mladunčadi, dok je visina seroprevalencije bila vezana uz dob i spol (MÜLLER i sur., 2011.). CASADES-MARTI i sur. (2019.) ustanovili su da visok udio seropozitivnih jedinki u populaciji povećava vjerojatnost zaraze divljih svinja koje nisu bile ranije u kontaktu s ovim virusom te da je jedini čimbenik s kojim se može procijeniti pritisak infekcije pojava novih infekcija tijekom prve godine života divlje svinje (kategorija prasadi).

U Hrvatskoj je dokazan prijenos virusa s vrste na vrstu (divlja svinja – pas) za kojeg je utvrđena visoka genska podudarnost sa sojem virusa divlje i domaće svinje (KEROS i sur., 2015.).

3. Obrazloženje teme

Cilj i pretpostavka istraživanja

Pretpostavka istraživanja jest da će prevalencija protutijela na virus bolesti Aujeszzkoga biti viša u staništima s većom populacijom divljih svinja, te da će biti viša u ženki i mladih dobnih kategorija u odnosu na mužjake.

Ciljevi istraživanja su:

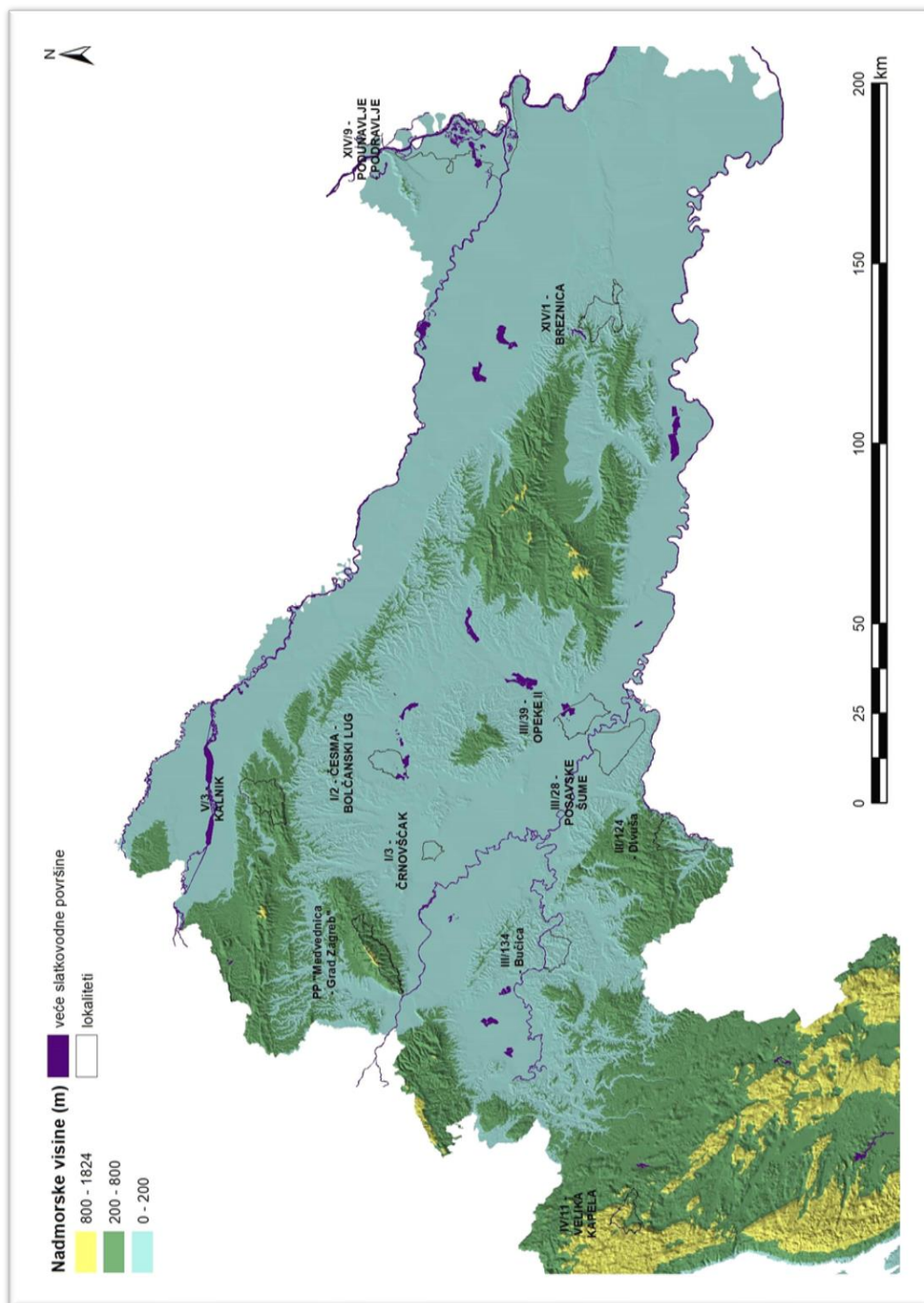
- 1) Utvrditi prevalenciju protutijela na virus bolesti Aujeszzkoga u divljih svinja.
- 2) Utvrditi postoje li razlike u pojavnosti seropozitivnih grla u odnosu na dobnu strukturu, spol i geografsko područje u pretraživanih divljih svinja.
- 3) Utvrditi postoji li korelacija u pojavnosti seropozitivnih nalaza u odnosu na brojnost i gustoću populacije divlje svinje u određenom području.
- 4) Utvrditi odnos seropozitivnih i PCR pozitivnih grla.

4. Materijal i metode

4.1. Uzorkovanje

4.1.1. Opis lokacija uzorkovanja

Uzorkovanje je provedeno u kontinentalnom, nizinskom i brdskom staništu Republike Hrvatske. Uzorci su prikupljeni u 10 lovišta i na području parka prirode Medvednica (ukupno 11 lokaliteta). Lokaliteti se nalaze na području pet županija i na području Grada Zagreba. Konkretno, uzorkovanje je provedeno u dva lovišta Zagrebačke županije, četiri lovišta Sisačko-moslavačke županije, jednom lovištu Karlovačke županije, jednom lovištu Varaždinske županije, dva lovišta Osječko-baranjske županije te u Parku prirode Medvednica (Grad Zagreb). Ovakvim odabirom lokacija uzorkovanja, obuhvaćana su tri različita bonitetna razreda, kao i tri stanišna tipa (nizinski, brdski i gorski). Ukupna površina svih lokaliteta uzorkovanja je 101 817 ha. Ujedno, uzorkovanjem su obuhvaćene populacije divljih svinja u slobodnoj prirodi (otvorena lovišta) i u ograđenom uzgoju (gater).



Slika 4. Mapa lokacija uzorkovanja s prikazom reljefa

Tablica 1. Geografska lokacija, površina i bonitetni razred lokacija uzorkovanja

RBR lokaliteta	Županija	UKUPNA POVRŠINA (ha)	LOVNA POVRŠINA (ha)	LPP (ha)	BONITETNI RAZRED
1	Zagrebačka	5267	4112	1200	I. NIZINSKO
2	Zagrebačka	2178	1716	800	I. NIZINSKO
3	Sisačko- moslavačka	8900	8600	2200	II. BRDSKO
4	Sisačko- moslavačka	6104	5328	2000	II. BRDSKO
5	Sisačko- moslavačka	12236	10491	4300	I. NIZINSKO
6	Sisačko- moslavačka	8342	7951	5000	I. NIZINSKO
7	Karlovačka	5398	5333	2900	III. GORSKO
8	Varaždinska	9472	9012	4000	I. NIZINSKO
9	Osječko- baranjska	8660	8515	5800	I. NIZINSKO
10	Osječko- baranjska	26810	18712	12700	I. NIZINSKO
11	Grad Zagreb	8450	8071	2327	II. BRDSKO

4.1.2. Broj uzoraka

Ukupno su uzorkovane 222 divlje svinje po lokalitetima kako slijedi.

Tablica 2. Broj uzoraka prema lokaciji.

RBR lokaliteta	Županija	Broj uzoraka po lovištu
1	Zagrebačka	20
2	Zagrebačka	38
3	Sisačko-moslavačka	6
4	Sisačko-moslavačka	6
5	Sisačko-moslavačka	8
6	Sisačko-moslavačka	29
7	Karlovačka	21
8	Varaždinska	15
9	Osječko-baranjska	31
10	Osječko-baranjska	33
11	Grad Zagreb	15

Uzorkovane su odstrijeljene divlje svinje prema dostupnosti uzoraka s naknadnom raspodjelom prema spolu i dobnim kategorijama. Dob divljih svinja je procijenjena prema kriterijima danima od strane WAGENKNECHT (1984.), uz naknadno razvrstavanje u tri kategorije, prasad, nazimad i odrasla grla (s navršene dvije godine života i više). Na ovaj način umanjena je mogućnost pogreške u razvrstavanju svinja prema dobi u odnosu na redovito kategoriziranje na mladunčad, pomladak, mlada, srednjedobna i zrela grla (ANONIMUS, 2006.).

Tablica 3. Prikaz broja uzoraka po dobnoj i spolnoj strukturi

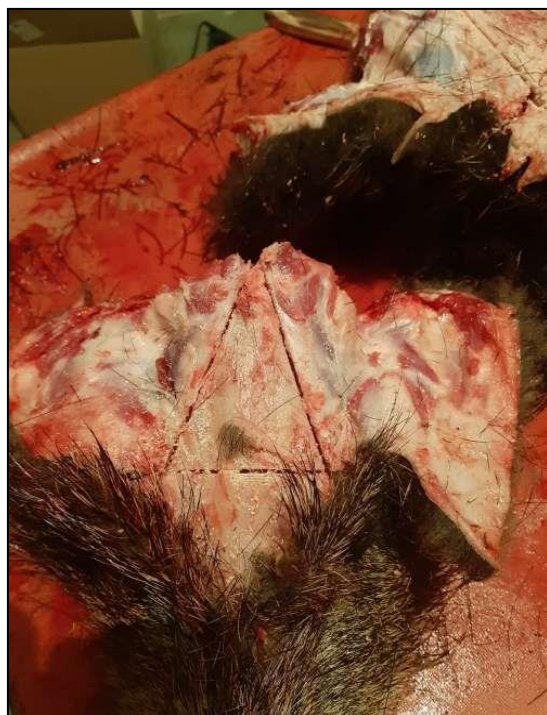
Redni broj lokaliteta	Ukupan broj uzoraka	Spol		Procijenjena dob		
		Muški	Ženski	< 1 god	1-2 god	>2 god
1	20	7	13	9	4	7
2	38	16	22	6	18	14
3	6	4	2	2	3	1
4	6	2	4	3	3	0
5	8	2	6	1	0	7
6	29	10	19	1	15	13
7	21	13	8	10	5	6
8	15	3	12	8	5	2
9	31	18	13	20	2	9
10	33	14	19	17	6	10
11	15	6	9	3	7	5
Ukupno	222	95	127	80	68	74

4.2. Vrsta uzoraka i način uzorkovanja

Odmah po odstrelu divljih svinja, izravno na terenu uzorkovana je krv, slezena, kranijalni režanj pluća i njušne lukovice. Uzorci pune krvi (3 – 5 ml) uzorkovani su pomoću brizgalice i igle izravno iz srca divlje svinje, a u slučajevima kada u srcu nije bilo krvi, ista je uzimana iz velikih krvnih žila, izravno ili nakon dekapitacije. Uzorak slezene i prednjega dijela plućnoga krila uzorkovani su „in situ“, veličine oko 5 x 5 x 5 cm. Uzorci njušnih lukovica uzorkovani su tako da je s područja dorzalne strane lubanje divlje svinje, s čeone i tjemene kosti oguljena koža s potkožjem kako je i prikazano na slikama 5 i 6.



Slika 5. Glava divlje svinje
(Autor: Ivica Sućec)



Slika 6. Oguljena koža i rezovi na lubanji
(Autor: Ivica Sućec)

Nakon toga pilom za kosti otvorena je lubanja s tri reza od kojih prvi rez spaja nadočne lukove čeone kosti (otprilike u razini *proc. zygomaticus ossis temporalis*), a druga dva reza načinjena su iz spoja tjemene kosti (simfize) i spajaju se s prvim rezom iznad očnih lukova kako je prikazano na fotografiji 7. Nakon otvaranja lubanje rukom se otpreparirao mozak na način da se oslobodi prostor lubanje, kako bi se pincetom mogle uzorkovati njušne lukovice.



Slika 7. Otvaranje lubanje
(Autor: Ivica Sućec)



Slika 8. Uzorkovanje njušnih lukovica
(Autor: Ivica Sućec)

Svi uzorci su pohranjeni na hladnom do laboratorijskih pretraga koje su provedene unutar 24 sata od uzorkovanja.

4.3. Metode pretraživanja uzoraka

Prikupljeni uzorci krvi pretraženi su imunoenzimskim testom na prisutnost protutijela za gpl protein virusa bolesti Aujeszzkoga u serumu divljih svinja u svrhu utvrđivanja seroprevalencije. Istodobno, u uzorcima slezene, prednjih režnjeva pluća i njušnih lukovica, u kojima se očekuje dulje zadržavanje virusa, provedeno je pretraživanje lančanom reakcijom polimerazom na prisutnost virusne DNK.

4.3.1. Serološko pretraživanje uzoraka seruma imunoenzimskim testom (ELISA)

Imunoenzimski test omogućava brzu, jednostavnu, osjetljivu i specifičnu metodu dokazivanja protutijela na gpl protein virusa bolesti Aujeszzkoga u serumu svinja. Antigen (PRV gpl) vezan je za stijenke polistirenske mikrotitracijske pločice koja sadrži 96 (12 x8) jažica. Serum se dodaje u razrjeđenju 1:2. Tijekom prve inkubacije PRV protutijela prisutna u uzorku seruma, uključujući i protutijela za gpl antigen, ulaze u reakciju s proteinom na mikroploči. Nakon inkubacije i ispiranja dodaje se u jažice specifični konjugat (Anti-PRV gpl HRPO konjugat), odnosno monoklonska protutijela obilježena peroksidazom koja imaju sposobnost vezivanja za gpl antigen tijekom druge inkubacije. Ako specifična gpl protutijela za PRV nisu prisutna u ispitivanom serumu, gpl monoklonska protutijela obilježena peroksidazom i vežu se za slobodan gpl antigen. Međutim, ako su specifična gpl protutijela za PRV prisutna u ispitivanom serumu, obilježena konjugirana monoklonska protutijela su blokirana te ne reagiraju s antigenom. Nakon inkubacije i ispiranja s ciljem uklanjanja nevezanog konjugata, dodaje se supstrat/kromogen i dolazi do pojave plave boje. Optička gustoća mjeri

se spektrofotometrom upotrebom filtra od 650 nm. Rezultat se dobije izračunom i to tako da se srednja vrijednost optičke gustoće (OD = optical density) uzorka podijeli sa srednjom vrijednosti OD negativne kontrole i dobije se vrijednost S/N (uzorak/neg. kontrola). Prisustvo PRV protutijela, uključujući anti-gpl, ukazuje na prijašnju izloženost divljim sojem PRV (tj. infekciji) ili vakcinaciji konvencionalnim vakcinama. Ako su svinje cijepljene gpl-deletiranim cjepivom, reakcija će ostati negativna primjenom metode HerdCHEK Anti-PRV gpl.

4.3.2. Priprema uzorka za dokazivanje DNK bolesti Auješkoga

Organi su u laboratoriju usitnjeni u homogenizatoru ili u tarioniku pomoću tučka i kvarcnoga pijeska. Usitnjeno je tkivo homogenizirano s puferom za liziranje stanica ili s PBS-om u omjeru 1:10 (1 dio tkiva + 9 dijelova pufera za liziranje/PBS-a) uz dodatak kuglica za homogenizaciju ili kvarcnoga pijeska. Alternativno se uzorci mogu smrznuti te se mala količina tkivne strugotine pomiješa s puferom za liziranje stanica/PBS-om (omjer 1/10) i dodatno vorteksira na automatskoj tresilici. Suspenzija se centrifugira 5 min/10000 rpm-a. Supernatanti (količina ovisi o metodi izolacije) prebacuju se u odgovarajuće epruvete za izolaciju nukleinskih kiselina, a po potrebi (izolacija virusa na staničnoj kulturi) se filtriraju kroz filter (promjera pora do 0,45 µm).

Svaki uzorak obilježen je jedinstvenim brojem i oznakom uzorka, kako bi se osigurala prepoznatljivost i sljedivost.

Krv je odvojena od stijenki epruveta sterilnom špatulom. Epruveta se centrifugirala 10 – 20 min. pri 1 500 do 3 000 okretaja u minuti. Pri centrifugiranju došlo je do taloženja korpuskularnih elemenata iz krvi pri čemu se odvojio serum.

Serum se prebacio u nove epruvete (za jednokratnu uporabu) u količini od 300-1 000 µl. Izvorna epruveta čuvala se tijekom 3 dana nakon završetka pretraživanja na +4 do +8°C.

4.3.2.1 Izolacija DNK na 96-jažičnim mikrotitracijskim pliticama

Metoda je prilagođena uputama opisanim u Priručniku „MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit“.

4.3.2.2. Korišteni uređaji i oprema

Za automatsku izolaciju putem magnetnih kuglica na mikrotitracijskoj plitici potrebna je sljedeća oprema:

- MagMAX 96 komplet za izdvajanje virusne DNK/DNK
- 96-jažične mikrotitracijske plitice s U-dnom i odgovarajuće pokrovnice
- multikanalna pipeta sterilnih nastavaka
- pipete 10 – 100 µl
- automatizirani uređaj za izolaciju DNK/DNK (King Fisher Flex).

4.3.2.3. Reagensi

U postupku izolacije DNK korišteni su sljedeći reagensi:

- pufer za razgradnju/povezivanje (Lysis/Binding Solution, koncentrat)
- otopina za ispiranje 1 (Wash Solution 1, koncentrat)
- otopina za ispiranje 2 (Wash Solution 2, koncentrat)
- elucijski puffer (Elution Buffer)
- otopina s paramagnetnim kuglicama za vezanje DNK (Bead Mix)
- nosač DNK (Carrier DNA)
- pojačivač razgradnje/vezivanja (Lysis/Binding Solution)
- 100 %-nii etanol
- 100 %-ni izopropanol.

Nosač DNK (Carrier DNA) i pojačivač razgradnje/vezivanja (Lysis/Binding Solution) pohranjen je na temperaturi od -20°C , a otopina s paramagnetnim kuglicama za vezivanje DNK (Bead Mix) pri $\pm 4^{\circ}\text{C}$, dok su ostali korišteni reagensi pohranjeni pri sobnoj temperaturi.

4.3.2.4. Biološki materijali

Od bioloških materijala u provedbi ove metode korišteni su uzorci organa/tkiva (pluća, slezena i njušne lukovice), a mogu se koristiti homogenizati, supernatanti, stanična kultura, puna krv, serum i plazma.

4.3.2.5. Pripremanje otopina za rad

Prije početka provođenja postupka pripremljene su otopine kako slijedi:

- otopina za ispiranje 1: dodati 100 % isopropanol prije upotrebe
- otopina za ispiranje 2: dodati 100 % etanol prije upotrebe
- pufer za razgradnju/povezivanje pripremljen je na način da se u 65 μ l koncentrata doda 1 μ l DNK nosača i 65 μ l 100 % isopropanola te se dobro promiješa
- otopina koja sadrži paramagnetne kuglice za vezivanje DNK za jedan uzorak: DNK binding beads 10 μ l + Lysis/Binding Enhancer 10 μ l
- reagensi su pripremljeni prema propisima za svaki uzorak uz dodatak od minimalno 10 %.

4.3.2.6. Postupak

Postupak izolacija DNK na 96-jažičnim mikrotitracijskim pliticama može se provesti ručno ili automatski. Prilikom provođenja postupka izolacije u ovom radu koristio se automatski postupak na sljedeći način:

Priprema plitica

1. Priprema Lysis/Binding Solution (za jedan uzorak) Lysis/Binding Solution

Concentrate 65 μ l

Carrier RNA 1 μ l

100 % Isopropanol 65 μ l

2. Priprema Elution Buffer pločice (standard plate)
 - u svaku jažicu odpipetirati 90 μ l Elution Buffer-a
3. Priprema Wash Solution 1 pločica (2 komada deep well plate)
 - u svaku jažicu odpipetirati 150 μ l Wash Solution 1
4. Priprema Wash Solution 2 pločica (2 komada deep well plate)
 - u svaku jažicu odpipetirati 150 μ l Wash Solution 2
5. Priprema pločice s Bead Mix + uzorak (50 μ l) + Lysis/Binding solution (deep well plate)
 - A.- priprema Bead Mix – 10 μ l Binding Beads + 10 μ l Lysis Enhancer (za jedan uzorak)
 - B. – u svaku jažicu odpipetirati
 - 20 μ l Bead Mix-a
 - 50 μ l uzorka
 - 130 μ l Lysis/Binding Solution

Postavljanje na stroj, program: MagMax Pathogen, High Volume 96 DW.

4.3.2.7. Produkti

Kvaliteta i količina izolirane DNK može se odrediti spektrofotometrijski (A260/280) i gel elektroforezom. Metodom se izdvoji najmanje 75 % ukupne DNK iz uzorka.

4.3.3. Umrežena lančana reakcija polimerazom (Nested polymerase chain reaction)

Ciljni odsječak za umnožavanje je unutar visoko postojane regije gena za kodiranje glikoproteina gB (RUIZ-FONS i sur., 2007.). U pripremi prve reakcijske smjese korišteni su reagensi 10 x PCR pufer, MgCl₂, H₂O, 10mM dNTP uz Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, SAD) te vanjske početnice PRV-P1 (5' - ATGGTGGAGGTGCCCGAGACG - 3', nt 2308 - 2328) i PRV-P2 (5' - GCGCCCACGTCGCCGAGGCCCTGGAAGAAG - 3', nt 2541 - 2570). Zavisno o broju uzoraka određen je *master mix* od kojega je po 22 µL izmiješan s 3 µL DNK. Također je primijenjena i pozitivna kontrola PRV, koja je od divlje svinje dobivena pasažom preko kunića.

Uzorci su postavljeni u Thermocycler uređaja Gene Amp – PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) te su provedeni kroz 35 ciklusa propisanoga temperaturnoga profila: prvotna denaturacija 94°C kroz 1 min, denaturacija pri 94°C tijekom 30 s, povezivanje pri 61°C tijekom 30 s, produljivanje molekule pri 72 °C tijekom 45 s te završno izduživanje pri 72 °C tijekom 3 min.

Nakon prvoga slijeda amplifikacije za dobivene PCR produkte ponovno je priređena reakcijska smjesa navedenih reagensa, te unutarnje početnice PRV-P3: (5'-GAACCTGACGCTGCTGGAGGACCG-3', nt 2349-2372) i PRV-P4: (5'-AGGCCCTGGAAGAAGITGGCGATGC-3', nt 2531-2555). Zavisno o broju uzoraka izračunat je *master mix* od kojega su po 22 µL izmiješana s 3 µL prvog

PCR produkta. Uzorci su u uređaju Gene Amp PCR System 9700 provedeni kroz 35 ciklusa temperaturnih profila: 94 °C - 1 min, 94 °C - 30 s, 61 °C - 30 s, 72 °C - 45 s i 72 °C - 3 min.

4.3.4. Analiza PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu

Produkti PCR analizirani su elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu. Pri tome je s 30 ml 10 x TAE pufera uz dodatak 270 ml destilirane vode pripremljena smjesa koja se rabi pri zagrijavanju gela u kadici za gel elektroforezu. Gel se priređuje tako da se u tikvicu umiješa 1,5 mg Ultra Pure™ agarose (Invitrogen) kojemu se dodaje TAE pufer do razine od 100 ml. Sadržaj se promiješa i smjesu zagrijava dvije ili tri minute do potpunoga otapanja gela, a zatim se tikvica ohladi pod vodom. U kadicu za elektroforezu dodaje se etidijev bromid, a preko njega se prelije priređena otopina gela, koja se mora dobro promiješati kako bi se spriječilo stvaranje mjehurića u gelu.

U PCR produkte umiješan je 1 µL obojenoga pufera 10 x Blue Juice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen) na parafilmu i po 6 µL uzorka postavljeno je u zasebne jažice kadice, a zbog kontrole dodan je marker TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Elektroforeza je provedena tijekom 60 minuta pri sobnoj temperaturi pri 60 do 70 V i 90 mA. U očitavanju rezultata korištena je ljestvica DNK sa 100 bp (DNA Ladder marker), a rezultati su očitani pomoću uređaja UV-transiluminator (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska).

4.3.5. Dokazivanje DNK virusa bolesti Aujeszzkoga lančanom reakcijom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Za dokaz DNK virusa bolesti Aujeszzkoga koristila se visoko osjetljiva i specifična metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (WENJUN i sur., 2008.), koja ujedno omogućuje prepoznavanje specifičnih regija genoma virusa, i to dijela koji kodira za glikoprotein E (gE), te regije koja kodira za glikoprotein B (gB). Ovom je metodom moguće detektirati DNK virusa PRV u moždanom tkivu domaćih i divljih vrsta životinja, te dodatno i u uzorcima seruma, plazme, krvi kojoj je dodan antikoagulans, te potom i u placenti, lohijama, pobačenim plodovima i uzorcima drugih tkiva i organa domaćih i divljih svinja.

Metoda koristi komplet: highQu qPCR Probe ROX L (one step) te Probe (gB785P): 59-ACGTCATCGTCACGACC-3994: Forward primer (gB718F): 9-ACAAGTTCAAGGCCACATCTAC-3994; Reverse primer (gB812R): 59-GTCYGTGAAGCGGTTTCGTGAT-3994PRV gE gene i Probu (gE708P): 59-TTCGACCTGATGCCGC-3972 Forward primer (gE694F): 59-CTTCCACTCGCAGCTCTTCTC-3972 Reverse primer (gE765R): 59-GTRAAGTTCTCGCGGAGT-3972.

Prva etapa podrazumijeva izolaciju virusne DNK, a druga lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

4.3.5.1. Priprema uzoraka za qRT-PCR u 0,2 ml epruveti

Priprema Master Mix-a (za 1 uzorak):

1Step RT qPCR Mix, 2x 10 μ l

Mix Primeri/Proba 2 μ l

RNase-free H₂O 5 μ l

17 μ L mix-a + 3 μ L izolata DNK

Temperaturni program: 95°C 2 min

95°C 5 s

62°C 30 s 45 x

Nakon završenoga postupka rezultati su prikazani u računalu kao krivulje fluorescencije/umnožavanja i kao Ct vrijednost FAM-a i HEX-a (interna kontrola) za svaki uzorak posebno. Prije nego su prihvaćeni rezultati računalnoga programa pregledane su amplifikacijske krivulje pojedinačno za svaki uzorak. Analiza je valjana ako su pozitivne kontrole (interna pozitivna kontrola) dale pozitivan rezultat u očekivanom rasponu, a negativna kontrola negativan rezultat.

Primjer	A	B	C	D
FAM umnažanje	ne	da	da	ne
HEX umnažanje	da	da	ne	ne
Rezultat	negativno	pozitivno	jako pozitivno	neodređeno

4.3.5.2. Kriteriji za procjenu valjanosti rezultata

Kriteriji valjanosti testa s obzirom na signal u referentnim kontrolnim uzorcima su sljedeći:

1. Test se smatra valjanim, a uzorak pozitivnim na BA ako su zadovoljeni sljedeći kriteriji:

- uzorak ima signal i u FAM i u HEX kanalu, Ct < 45.
- pozitivna kontrola ima signal i u FAM i U HEX kanalu, Ct < 45.
- krivulje fluorescencije/umnožavanja imaju sigmoidan/logaritamski oblik.
- negativna kontrola nema signal niti u jednom kanalu.

Vrlo visoke koncentracije DNK u uzorku mogu utjecati na smanjenje ili gubitak HEX signala zbog kompeticije s internom kontrolom.

2. Test se smatra valjanim, a uzorak negativnim na BA ako su zadovoljeni sljedeći kriteriji:

- uzorak ima signal u HEX kanalu (Ct < 45), ali nema u FAM kanalu ili je Ct > 45 i krivulja fluorescencije je linearna.
- pozitivna kontrola ima signal i u FAM i U HEX kanalu, Ct < 45.
- negativna kontrola nema signal niti u jednom kanalu.

Pozitivan HEX signal ukazuje na uspješnost izolacije i umnožavanja s obzirom na to da je *housekeeping* gen u uzorku umnožen. Ako je Ct vrijednost interne kontrole >35 uzorka je inhibiran, te se treba razrijediti (npr. razrjeđenje 1 : 5) vodom bez nukleaza i ponovno testirati.

3. Test se smatra valjanim, a rezultat dvojbena ako:

- uzorak nema signal ni u jednom kanalu ili je Ct vrijednost <45 , a krivulja fluorescencije ima sigmoidan/logaritamski oblik.

Odsutnost signala „housekeeping“ gena ukazuje na inhibiciju lančane reakcije polimerazom. Kako bi se provjerilo radi li se o inhibiciji, provedeno je razrjeđivanje DNK u vodi bez nukleaza, te ponavljanje izolacije ili testa s novim materijalom. Limit detekcije odredio se testiranjem desetorostrukih serijskih razrjeđenja jako pozitivnoga referentnoga seruma te ispitivanjem kontrolnoga (negativnoga uzorka). Limit detekcije predstavlja najveće razrjeđenje virusa u kojem je još uvijek moguće detektirati virusnu RNA (postupak validacije).

Limit detekcije utvrđen postupkom validacije iznosi $Ct < 45$.

4.4. Epidemiološke i statističke analize

Presječno istraživanje (engl. *cross-section*) jedna je od studija u analitičkoj epidemiologiji koja je provedena u određenom vremenskom trenutku, čime je isključena vremenska komponenta iz istraživanja. Uzorkovanje u ovom obliku istraživanja je nasumično. Veličina populacije prema pojedinom lovištu određena je na temelju podataka iz Središnje lovne evidencije, koji prvenstveno za ovaj rad uključuju podatke o matičnim fondovima te lovnoj i lovnoproduktivnoj površini za divlju svinju. Iz dobivenih podataka određena je prevalencija i prevalencijski omjer izgleda (POR) pozitivnih u odnosu na negativna grla.

Razlike u učestalosti bolesti Aujeszskog među spolovima ispitani su Fisherovim egzaktnim testom (ZAR, 1999.), χ^2 testom te *McNemar* χ^2 testom. Granična vrijednost χ^2 testa uz jedan stupanj slobode na razini značajnosti od 5 % iznosi 3,842.

U analizi i izboru modela korišten je programski alat Akaike Information Criterion (AIC_c, BURNHAM i ANDERSON, 2002.). Izbor modela uslijedio je ako je $\Delta AIC < 2$ jedinice. Isto tako izračunata je i Akaikeova težina (w_i), koja predstavlja vjerojatnost da je model najbolji među ostalim uspoređivanim modelima. Temeljna postavka AIC analize jest da se neka pojava (zavisna varijabla) treba opisati sa što manje nezavisnih varijabli (pretkazivača). Pri tome je najpovoljniji model onaj s najnižom AIC vrijednosti.

Za izračun pretkazivanja zaraženosti životinje virusom bolesti Aujeszskog ELISA AB gpl IDEXX (1 = negativan nalaz ELISA AB gpl IDEXX ili 0 = pozitivan nalaz ELISA AB gpl IDEXX) korištena je logistička stepenasta regresija unaprijed (HOSMER i LEMESHOF, 2000.). Za određivanje statističke znakovitosti svakog modela, korišten je log-likelihood ratio test. Znakovitost koeficijenata zavisnih varijabli (pretkazivača) je bazirana na χ^2 Wald statistici (Waldov χ^2). Relativna značajnost nezavisnih varijabli (pretkazivača) unutar svakog modela, dobivena je množenjem višestrukih koeficijenata logističke regresije (β) sa standardnom devijacijom svake varijable. Za procjenu doprinosa rasta jedinice nezavisnih varijabli (pretkazivača) na vjerojatnost WVC-a, korišten je omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR). Omjerom izgleda procjenjuje se jesu li izgledi za određeni događaj ili ishod jednaki kod obje skupine ispitanika. Točnije, s OR se mjeri omjer

izgleda da će jedan događaj ili rezultat nastupiti te izgleda da će taj događaj izostati.

Za razliku od linearne (višestruke) regresije, logistička regresija koristi logističku krivulju za određivanje odnosa između nezavisnih i zavisnih varijabli. Logistička regresija predstavlja vrstu regresijske analize u kojoj je zavisna (odzivna) varijabla dihotomna, odnosno binarna i kodira se s 0 ili 1 te postoji najmanje jedna nezavisna odnosno prediktorska varijabla. Regresijski koeficijenti kod logističke regresije se interpretiraju kao kod obične regresije – što veći koeficijent to je veći utjecaj nezavisne varijable na zavisnu, pod pretpostavkom male i nikakve kolinearnosti. Međutim, ako se želi dobiti vrijednost zavisne varijable (vrijednost između 0 i 1), tada vrijednost dobivena izračunom modela

$$\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots$$

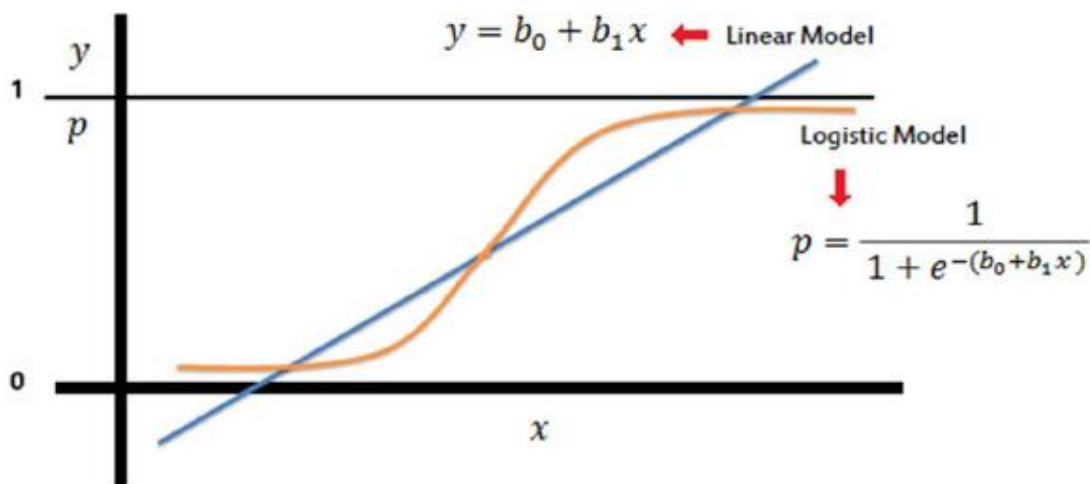
ne daje izravno vrijednost zavisne varijable nego predstavlja vrijednost logaritma kojim se mora potencirati prirodna baza (e) da bi se dobila vrijednost zavisne varijable logističke (logit) regresije. Točnije vrijednost zavisne varijable logit regresije dobije se prema obrascu

(<http://www.math.wpi.edu/saspdf/stat/chap39.pdf>):

$$p = \frac{1}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}}$$

Uz pretpostavku pozitivne koreliranosti uspjeha s nezavisnim varijablama, na vrlo niskim razinama vrijednosti nezavisne varijable vjerojatnost doseže gotovo do vrijednosti 0. Slično, s porastom vrijednosti nezavisne varijable

vjerojatnost podiže krivulju, ali onda nagib počinje opadati, tako da će uz povećanje razine nezavisne varijable vjerojatnost težiti prema 1.



Slika 9. Logistička regresija (Izvor: BISTROVIĆ, 2018.)

Osnovna mjera koja pokazuje koliko dobro procjena maksimalne vjerodostojnosti odgovara opaženim vrijednostima zavisne varijable odgovara dvostrukoj vrijednosti logaritamske vjerodostojnosti $-2LL$ (eng. two times log likelihood). Minimalna vrijednost za $-2LL$ je 0, što odgovara savršenom prilagođavanju (likelihood = 1 i $-2LL = 0$). Što je niža vrijednost $-2LL$, model je bolje prilagođen. Vrijednost $-2LL$ može se koristiti za uspoređivanje jednadžbi ugniježđenih modela (eng. nested models) ili izračunavanje mjera usporedivih s R^2 mjerama u višestrukoj linearnoj regresiji. Pseudo R^2 mjere tumače se na način sličan koeficijentima determinacije u višestrukoj linearnoj regresiji, a u ovoj analizi korišten je Nagerkerkeov R^2 (NAGERKERKE, 1991.). Vrijednost dobivena množenjem pseudo R^2 sa 100 predstavlja postotak determinirane varijance pretkazivača, odnosno točnost modela.

Tablica 4. Rezultati nalaza ELISA AB gpl IDEXX po lokalitetima

LOKALITETI	ELISA AB gpl IDEXX	Ukupno	Muški	Ženski	PRASAD	NAZIMAD	VEPOVI I KRMAČE
PP "Medvednica - Grad Zagreb"	Pozitivni	4	1	3	0	0	1
	Negativni	11	5	6	1	3	1
I/3 - ČRNOVŠČAK	Pozitivni	15	4	11	0	1	3
	Negativni	23	12	11	2	9	1
III/134 - Bučica	Pozitivni	5	1	4	0	1	0
	Negativni	1	1	0	1	0	0
III/39 - OPEKE II	Pozitivni	13	4	9	0	0	4
	Negativni	16	6	10	1	4	1
III/124 - Divuša	Pozitivni	2	1	1	0	1	0
	Negativni	4	3	1	1	2	0
IV/11 - VELIKA KAPELA	Pozitivni	1	0	1	0	0	0
	Negativni	20	13	7	4	5	4
XIV/9 - PODUNAVLJE - PODRAVLJE	Pozitivni	10	5	5	0	1	4
	Negativni	23	9	14	8	1	0
III/28 - POSAVSKE ŠUME	Pozitivni	7	1	6	0	0	1
	Negativni	1	1	0	1	0	0
I/2 - ČESMA - BOLČANSKI LUG	Pozitivni	7	3	4	2	0	1
	Negativni	13	4	9	3	1	0
XIV/1 - BREZNICA	Pozitivni	8	2	6	0	0	2
	Negativni	23	16	7	14	1	1
V/3 - KALNIK	Pozitivni	3	2	1	1	1	0
	Negativni	12	1	11	1	0	0
UKUPNO	Pozitivni	75	24	51	3	5	16
	Negativni	147	71	76	37	26	8

Budući da se u analizama moraju koristiti brojčani, svakom svojstvu unutar atributa dodijeljene su brojčane oznake kako slijedi:

- ✓ Rezultati ELISA AB gpl IDEXX testa: 1 – negativan nalaz ELISA AB gpl IDEXX, 0 – pozitivan nalaz ELISA AB gpl IDEXX, pri čemu je referentna skupina bila 0 (pozitivan nalaz), odnosno koeficijenti odaju

utjecaj nezavisnih varijabli na vjerojatnosti jedinke koja ima pozitivan nalaz (0).

- ✓ Spol: 1 – mužjaci, 0 – ženke.
- ✓ Dobni razred: 0 – prasad, 1 – nazimad, 2 – veprovi i krmače.
- ✓ Tip lovišta prema nadmorskoj visini: 1 – nizinsko, 2 – nizinsko-brdsko i 3 – brdsko.
- ✓ Tehnika lova: 0 – pojedinačni lov (doček na čeki) i 1 – skupni lov (pigonom).
- ✓ Udio je pojedinoga tipa staništa izražen u postotku.

Dobiveni podatci analizirani su pomoću Statsoft 13.5.0.17 programa (TIBCO Software Inc. 2018. Statistica (data analysis software system), version 13. <http://tibco.com>).

5. Rezultati

5.1. Rezultati seroloških i molekularnih analiza

Rezultati seroloških i molekularnih analiza prikazani su u Tablici.

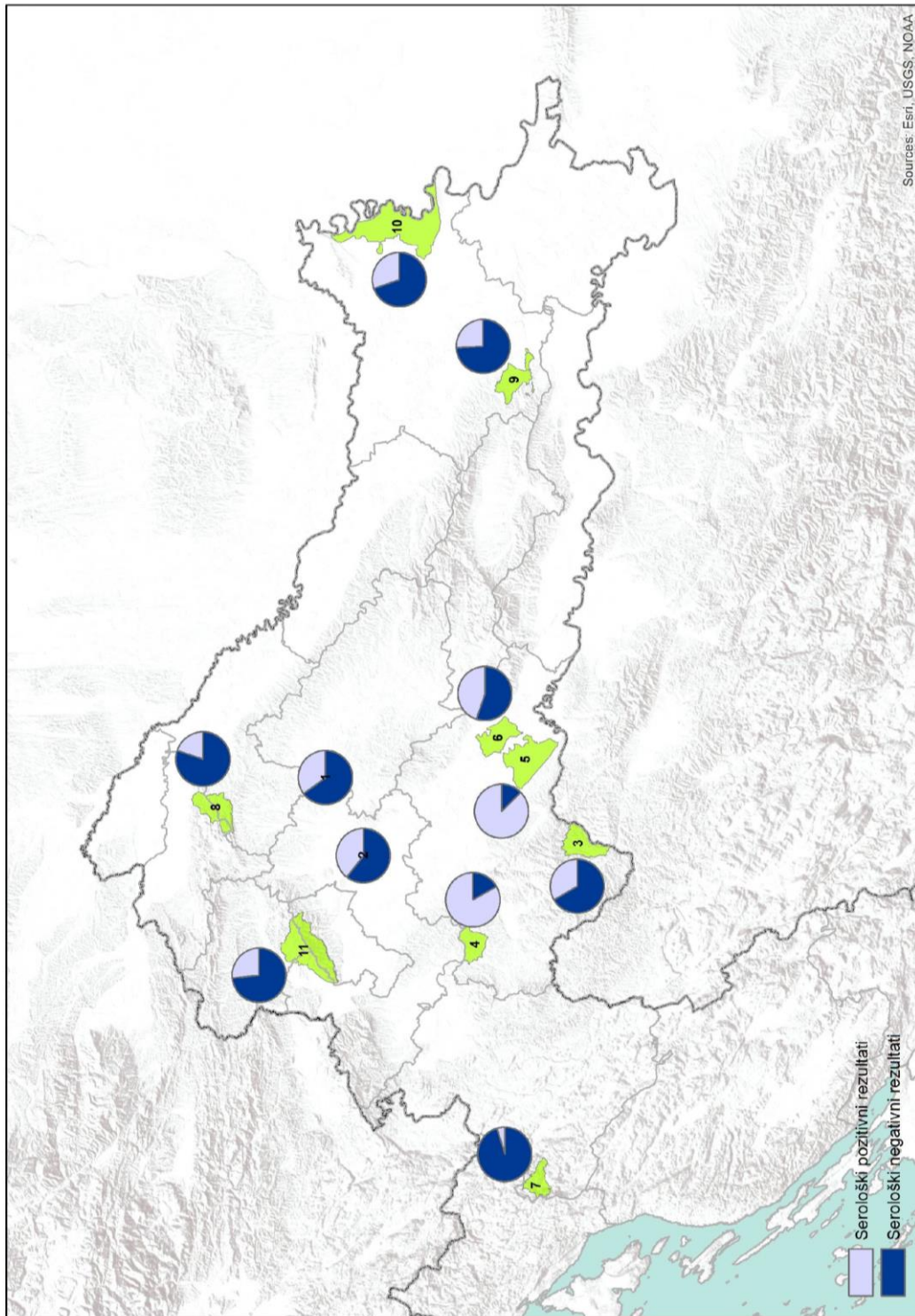
Tablica 5. Podaci o životinjama i nalaz pretraga

Sezona uzorkovanja	Županija	Procijenjena dob	Spol životinje	ELISA AB gpI IDEXX	real time PCR
2018/2019	Grad Zagreb	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	> 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	> 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	> 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	> 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Karlovačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	1 – 2 g.	M	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	6 mj. – 1 g.	Ž	pozitivno	negativno

2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 - 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Grad Zagreb	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Sisačko moslavačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Zagrebačka	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2018/2019	Varaždinska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2018/2019	Varaždinska	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno

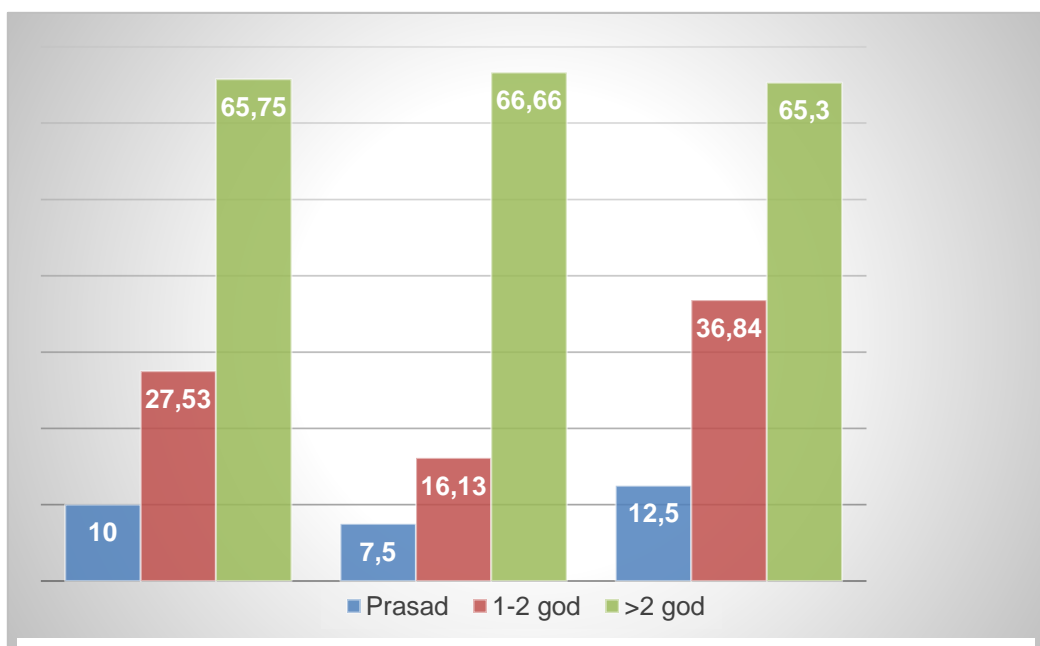
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Zagrebačka	6 mj. – 1 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	Ž	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	M	pozitivno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	1 – 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	Ž	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	6 mj. – 1 g.	M	negativno	negativno
2019/2020	Osječko-baranjska	> 2 g.	M	pozitivno	negativno

Iz Tablice je razvidno kako niti jedan uzorak njušnih lukovica, slezene ili kranijalnoga dijela pluća nije bio pozitivan PCR pretragom na virus bolesti Aujeszkoga.



Slika 10. Omjer serološki pozitivnih i negativnih grla prema lokaciji uzorkovanja

Ukupno promatrano, u ovom istraživanju utvrđena je prevalencija od 33,78 % serološki pozitivnih divljih svinja na virus bolesti Aujeszzkoga. Prema spolu, prevalencija u mužjaka iznosi 25,26 %, a u ženki 40,15 %. Omjer izgleda (*odds ratio*) u ovom slučaju iznosi 1,9852 (CI 95 % 1,1080 – 3,5568). Dobivena vrijednost govori nam kako je 1,9 puta veća vjerojatnost da će ženke biti pozitivne u odnosu na mužjake. Vrijednost je i statistički znakovita na razini $p = 0,0212$ ($\chi^2 = 4,47$). Ako spolne razrede raščlanimo na dobne kategorije seroprevalencija u prasadi iznosi 10 %, u kategoriji grla od 1 do 2 godine iznosi 27,53 %, a u grla starijih od dvije godine 65,75 %. Pri tome je prevalencija kod mužjaka u kategoriji prasadi 7,5 %, a u ženki 12,5 %. Omjer izgleda u ovoj kategoriji kazuje da ženke imaju 1,7 puta veću vjerojatnost biti pozitivne (OR = 1,7619, CI 95 % 0,3915 – 7,9291). Ova vrijednost nije statistički znakovita ($p = 0,4605$). U kategoriji godišnjaka i grla u drugoj godini života seroprevalencija u mužjaka iznosi 16,13 %, a u ženki 36,84 %. U ovome slučaju, vjerojatnost da će ženke biti pozitivne 3 puta je veća u odnosu na mužjake (OR = 3,0333, CI 95 % 0,9489 – 9,6967). Ova je vrijednost statistički znakovita ($p = 0,0613$). U kategoriji grla starijih od dvije godine prevalencija je gotovo jednaka i iznosi 66,66 % za mužjake te 65,30 % za ženke.



Slika 11. Odnos prevalencije u dobnim kategorijama, ukupno i prema spolu (prvi red ukupno, drugi red mužjaci, treći red stupaca ženke).

Promatramo li rezultate pomoću *McNemar* χ^2 testa vidljivo je da postoji povezanost između frekvencija negativne muške nazimadi i pozitivnih nazimica (*McNemar* $\chi^2 = 1,53$; $p = 0,215$), pozitivnih veprova i negativnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 0,04$; $p = 0,8501$), odnosno na razini svih uspoređivanih jedinki postoji statistički znakovita identičnost između očekivanih frekvencija negativnih veprova i pozitivnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 0,49$; $p = 0,4839$).

Tablica 6. Rezultati testa ispitivanja razlika u rezultatima ELISA AB gpl IDEXX testa među dobnim kategorijama (brojevi označeni tamnim slovima ukazuju na statistički znakovitu razliku uz prag znakovitosti od 95 %.)

DOB	OČEKIVANE FREKVENCIJE		χ^2 vrijednost	p
	POZITIVNIH GRILA			
	MUŽJACI	ŽENKE		
PRASAD	1,64	8,20	3,11	0,078
NAZIMAD	8,48	20,34	1,64	0,20
VEPROVI I	25,59	47,54	0,64	0,4245
KRMAČE				
SVE ZAJEDNO	11,30	25,41	4,47	0,0346

Ispitivanje razlika između dobnih razreda unutar svakog spola pokazala je daleko veće statistički znakovite razlike između skupina. Kod mužjaka postoji razlika u svakoj od testiranih inačica. Od sva tri dobnja razreda, muška prasadi je značajno manje pozitivna na protutijela protiv virusa bolesti Aujeszzkog od nazimadi ($\chi^2 = 4,07$, $p < 0,5$) i veprova ($\chi^2 = 3,11$; $p < 0,05$), odnosno veprovi su znakovito učestalije pozitivni od nazimadi ($\chi^2 = 15,13$; $p < 0,0001$). Kod ženskih grla ta razlika nije izražena jedino između prasadi i nazimadi ($\chi^2 = 2,83$; $p = 0,0922$), dok su krmače učestalije pozitivne u odnosu na žensku prasadi ($\chi^2 = 19,27$; $p < 0,0001$) i nazimice ($\chi^2 = 8,62$; $p < 0,01$).

Zanimljiva je povezanost frekvencija između pozitivnih i negativnih svinja unutar svakoga testa. Tako su povezane frekvencije pozitivne prasadi i negativnih veprova (*McNemar* $\chi^2 = 0,80$; $p = 0,3711$), pozitivne nazimadi i negativnih veprova (*McNemar* $\chi^2 = 0,000$; $p = 1,000$) te negativne nazimadi i pozitivnih veprova (*McNemar* $\chi^2 = 0,46$; $p = 0,4990$). Kod ženskih grla ova je

povezanost frekvencija još učestalija. Testovi su pokazali znakovitu povezanost između frekvencija negativne ženske prasadi i pozitivnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 0,17$; $p = 0,68$), pozitivne ženske prasadi i negativnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 2,75$; $p = 0,0990$), negativnih nazimica i pozitivnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 0,71$; $p = 0,4008$) te pozitivnih nazimica i negativnih krmača (*McNemar* $\chi^2 = 0,000$; $p = 0,1,000$). Dakle, i kod jednog i kod drugog spola frekvencija pozitivne prasadi ne utječe na frekvenciju pozitivne nazimadi, dok u svim ostalim kombinacijama frekvencije pokazuju povezanost.

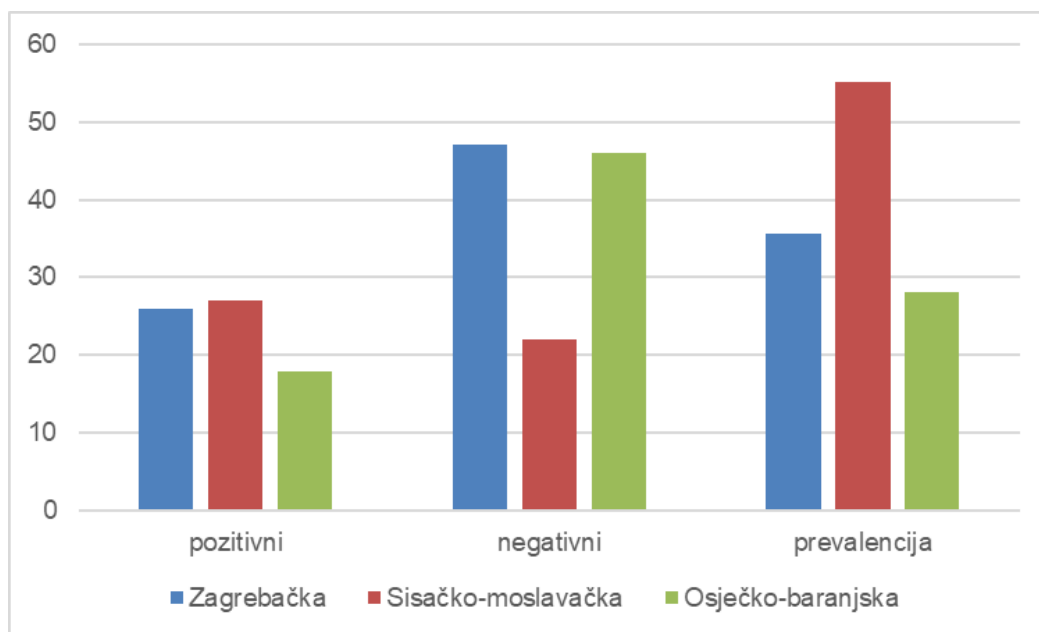
Tablica 7. Rezultati testa ispitivanja razlika u rezultatima ELISA AB gpl IDEXX testa među spolnim kategorijama (vrijednosti označene tamnim brojevima ukazuju na statistički znakovitu razliku uz prag znakovitosti od 95 %).

USPOREĐIVANE SKUPINE	MUŽJACI			ŽENKE		
	OČEKIVANE FREKVENCije	χ^2 vrijednost	p	OČEKIVANE FREKVENCije	χ^2 vrijednost	p
PRASAD	1,79			7,81		
NAZIMAD	8,93	4,07	0,0436	18,75	2,83	0,0922
PRASAD	2,00			6,94		
VEPROVI/ KRMAČE	30,00	31,04	0,0000	40,28	19,27	0,0000
NAZIMAD	11,36			15,79		
VEPROVI /KRMAČE	34,09	15,13	0,0001	38,16	8,62	0,0033

Promatramo li prema lokaciji uzorkovanja dobivamo sljedeće prevalencije serološki pozitivnih grla. Na području Parka prirode Medvednica utvrđena je prevalencija od 26,66 %, lovišta br. I/3 - "ČRNOVŠĆAK" P = 39,47 %, lovišta br. I/2 - "ČESMA – BOLČANSKI LUG" P = 35 %, III/124 – "DIVUŠA" P = 33,3 %,

III/134 – "BUČICA" P = 83,3 %, III/28 – "POSAVSKE ŠUME" P = 87,5 %, III/39 – "OPEKE II" P = 44,8 %, IV/11 – "VELIKA KAPELA" P = 4,7 %, V/3 – "KALNIK" P = 20 %, XIV/1 – "BREZNICA" P = 25,8 % i XIV/9 – "PODUNAVLJE-PODRAVLJE" P = 30,3 %.

Prema županijama, seroprevalencija na području Zagrebačke županije iznosi 35,6 %, na području Sisačko-moslavačke županije 55,10 % te na području Osječko-baranjske županije 28,12 %. Usporedbom pozitivnih i negativnih grla na području Zagrebačke i Sisačko-moslavačke županije dobivena je statistički znakovita razlika ($\chi^2 = 4,531$; $p = 0.033$), kao i na području Osječko-baranjske i Sisačko-moslavačke županije ($\chi^2 = 8,428$, $p = 0,0036$). Razlika između Zagrebačke i Osječko-baranjske županije nije statistički znakovita.



Slika 12. Prikaz pozitivnih i negativnih grla te prevalencije prema županijama.

5.2. Razvoj modela za procjenu vjerojatnosti zaraženosti virusom bolesti Aujeszskog

Prema kriteriju $\Delta AIC < 2$ jedinice izdvojen je 21 model procjene (predviđanja) zaraženosti virusom bolesti Aujeszskog. Broj pretkazivača kretao se od 4 (model broj 12) do 7. Model 16 ima 5 pretkazivača. Modeli 1, 2, 3, 5, 6, 8 i 14 imaju po 6 pretkazivača, dok najveći broj modela (njih 12) ima 7 pretkazivača. To su modeli: 4, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20 i 21. Vrijednost procijenjene varijance (Nagerkere-ov R^2) kretala se od 42,7 % (model 12) do 46,2 % (model 4), pri čemu se u većini modela ova vrijednost kretala oko 45 %.

Tablica 8. Izbor modela procjene zaraženosti svinja

RB	Model	K	AIC	Δ AIC	w_i	Nagerkere R^2
1.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šume + Gustoća populacije	6	178,90	0,00	0,02	0,457
2.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + šume + oranice + Gustoća populacije	6	179,19	0,29	0,02	0,455
3.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + vode + šume + Gustoća populacije	6	179,29	0,39	0,02	0,455
4.	dobni razredi + Spol + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šume + Gustoća populacije	7	179,79	0,89	0,01	0,462
5.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + oranice + Gustoća populacije	6	179,88	0,98	0,01	0,452
6.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + vode + oranice + Gustoća populacije	6	180,05	1,15	0,01	0,451
7.	dobni razredi + Spol + lovna tehnika + Nadm vis + šume + oranice + Gustoća populacije	7	180,09	1,19	0,01	0,461
8.	dobni razredi + lovna tehnika + vode + travnjaci + izgrađeno + Gustoća populacije	6	180,24	1,34	0,01	0,450
9.	dobni razredi + Spol + lovna tehnika + Nadm vis + vode + šume + Gustoća populacije	7	180,38	1,48	0,01	0,459
10.	dobni razredi + Spol + lovna tehnika + Nadm vis + vode + oranice + Gustoća populacije	7	180,71	1,81	0,01	0,458
11.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + šikare + šume + oranice + Gustoća populacije	7	180,71	1,81	0,01	0,458
12.	dobni razredi + lovna tehnika + šikare + oranice	4	180,73	1,83	0,01	0,427
13.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šikare + šume + Gustoća populacije	7	180,74	1,84	0,01	0,458
14.	dobni razredi + lovna tehnika + šikare + izgrađeno + Gustoća populacije + ROK	6	180,75	1,85	0,01	0,447
15.	dobni razredi + Spol + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + oranice + Gustoća populacije	7	180,77	1,87	0,01	0,457
16.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + šume + Gustoća populacije	5	180,77	1,87	0,01	0,437
17.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šume + izgrađeno + Gustoća populacije	7	180,84	1,94	0,01	0,457
18.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + vode + travnjaci + šume + Gustoća populacije	7	180,85	1,95	0,01	0,457
19.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šume + oranice + Gustoća populacije	7	180,86	1,96	0,01	0,457
20.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šikare + oranice + Gustoća populacije	7	180,87	1,97	0,01	0,457
21.	dobni razredi + lovna tehnika + Nadm vis + travnjaci + šume + Gustoća populacije + ROK	7	180,87	1,97	0,01	0,457

Predloženim modelima moguće je procijeniti zaraženu ili nezaraženu životinju s prosječnom točnošću od 77,12 do 78,67 %. Pri tome je točnost procjene pozitivnih jedinki oko 10 % manja nego točnost procjene negativnih jedinki i kreće se od 70,15 % (model 14) do 74,63 % (modeli 5, 6 i 8). S druge strane, točnost procjene negativnih jedinki kreće se od 82,46 % (modeli 5, 6 i 8) do 85,09 % (modeli 4, 7, 9 i 15). Modeli koji relativno dobro procjenjuju pozitivne jedinke divlje svinje (5, 6 i 8) u isto vrijeme su manje točni u procjeni negativnih grla.

Tablica 9. Točnost procjene zaraženosti divlje svinje s obzirom na model

Model	točnost procjene "0" (pozitivni)	točnost procjene "1" (negativni)	Prosječna procjena	Omjer	Log odds ratio	log	-2LL
				izgleda (Odds ratio)		likelihood (LL)	
1	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,45034	164,90068
2	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,59464	165,18927
3	73,13433	83,33333	78,23383	13,61111	2,61089	-82,64543	165,29086
4	71,64179	85,08772	78,36476	14,41486	2,66826	-81,89688	163,79376
5	74,62687	82,45614	78,54150	13,82353	2,62637	-82,93964	165,87927
6	74,62687	82,45614	78,54150	13,82353	2,62637	-83,02690	166,05380
7	71,64179	85,08772	78,36476	14,41486	2,66826	-82,04676	164,09352
8	74,62687	82,45614	78,54150	13,82353	2,62637	-83,11963	166,23926
9	71,64179	85,08772	78,36476	14,41486	2,66826	-82,18930	164,37860
10	73,13433	83,33333	78,23383	13,61111	2,61089	-82,35300	164,70600
11	73,13433	83,33333	78,23383	13,61111	2,61089	-82,35348	164,70696
12	71,64179	83,33333	77,48756	12,63158	2,53620	-85,36542	170,73084
13	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,37058	164,74117
14	70,14925	84,21053	77,17989	12,53333	2,52839	-83,37681	166,75361
15	71,64179	85,08772	78,36476	14,41486	2,66826	-82,38363	164,76726

16	70,14925	85,08772	77,61849	13,40882	2,59591	-84,38669	168,77339
17	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,41911	164,83821
18	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,42586	164,85173
19	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,42833	164,85665
20	73,13433	83,33333	78,23383	13,61111	2,61089	-82,43318	164,86636
21	73,13433	84,21053	78,67243	14,51852	2,67543	-82,43537	164,87075
MIN	70,14925	82,45614	77,17989	12,53333	2,52839	-85,36542	163,79376
MAX	74,62687	85,08772	78,67243	14,51852	2,67543	-81,89688	170,73084

Omjeri izgleda ne pokazuju veće razlike i kreću se od 12,53 do 14,52. To znači da one skupine grla za koje su modeli procijenili da će biti pozitivne imaju od 12,53 do 14,50 puta veću vjerojatnost da će biti pozitivni na bolest Aujeszskog, nego da će biti negativni. Respektirajući ove rezultate, usprkos tome što se $-2LL$ vrijednosti kreću od 163,79 do 170,73, što je daleko od vrijednosti 0, koja predstavlja idealan model, može se reći kako ovi modeli nude relativno visoku sigurnost predviđanja pojave bolesti Aujeszskog u istraživanim lovištima. Pri tome su posebice pogodni modeli 5, 6 i 8.

Tablica 10. Parametri modela procjene zaraženosti svinja

Model	konstanta	dobni razredi	Spol	lovna tehnika	Nadm vis	vode	travnjaci	šikare	šume	oranice	izgrađeno	GP	ROK
1	4,74	1,80		-5,44	-1,71		0,04		0,07			-2,20	
2	5,93	1,79		-4,44	-1,57				0,04	-0,03		-1,91	
3	5,21	1,78		-5,69	-1,79	0,09			0,07			-2,31	
4	5,17	1,77	-0,42	-5,54	-1,73		0,04		0,07			-2,22	
5	7,08	1,77		-3,16	-1,34		-0,05			-0,06		-1,52	
6	6,16	1,79		-2,98	-1,23	-0,08				-0,06		-1,41	
7	6,34	1,76	-0,42	-4,56	-1,59				0,04	-0,03		-1,93	
8	8,48	1,83		-6,27		-0,37	0,16				-1,48	-1,60	
9	5,55	1,75	-0,38	-5,74	-1,79	0,08			0,07			-2,31	
10	6,65	1,76	-0,46	-3,15	-1,27	-0,08				-0,06		-1,45	
11	9,99	1,81		-6,82	-2,00			-0,07	0,05	-0,03		-2,68	
12	-4,28	1,74		1,75				0,12		-0,03			

13	7,17	1,81	-6,77	-1,95		0,04	-0,04	0,07			-2,63		
14	9,92	1,78	-9,98				0,15			-1,63	-2,39	1,16	
15	7,45	1,74	-0,42	-3,31	-1,36	-0,05			-0,06		-1,55		
16	4,13	1,72	-4,09	-1,25				0,04			-1,70		
17	5,27	1,80	-5,69	-1,67		0,04		0,07		-0,10	-2,23		
18	4,89	1,80	-5,56	-1,75	0,02	0,03		0,07			-2,25		
19	4,01	1,81	-5,97	-1,77		0,07		0,09	0,02		-2,36		
20	15,01	1,80	-6,70	-2,06		-0,08	-0,12		-0,08		-2,69		
21	4,52	1,80	-5,22	-1,71		0,04		0,07			-2,14	-0,04	
<hr/>													
Učestalost javljanja u modelu	-	21	5	21	18	6	11	5	13	10	3	20	2

U razvoju 21 modela korišteno je 12 pretkazivača. Oni se mogu razdvojiti na pretkazivače populacije (dobni razredi, spol, gustoća populacije i relativna odstrelna kvota), pretkazivače lovne tehnike (tehnika lova) i pretkazivače staništa (nadmorska visina te udio pojedinih kategorija korištenja prostora). Kao najučestaliji pretkazivači javljaju se dobni razredi, koji su uvršteni u sve modele. Na drugome mjestu je gustoća populacije, koja nije uvrštena samo u model 12, no to je ujedno i model koji daje nisku točnost procjene pozitivnih (71,64 %) i negativnih grla (83,33 %), odnosno općenito gledano radi se o modelu s najnižom pouzdanošću ($-2LL = 170,73$). Ostali populacijski pretkazivači javljaju se relativno rijetko u modelu – spol se pojavio 5 puta (modeli 4, 7, 9, 10 i 15), a relativna odstrelna kvota (ROK) u samo 2 modela (modeli 14 i 21).

Predznaci koeficijenata dobiveni logit regresijom ukazuju na konačnu vrijednost zavisne varijable. Budući da uvrštavanjem spomenutih koeficijenata dobivamo logaritam modela iz kojeg se pomoću obrasca

$$p = \frac{1}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}}$$

dobiva vrijednost zavisne varijable (p), negativan predznak koeficijenata modela ukazuje i na moguću negativnu vrijednost logaritma, odnosno vrijednost $e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}$ će biti manja od 0, čime se, prema navedenoj formuli vrijednost p približava vrijednosti 1, koja ukazuje da jedinka nije pozitivna na bolest Aujeszkog.

Iz Tablice 10 vidljivo je kako samo koeficijent dobnih razreda ima pozitivan predznak, dok koeficijenti udio travnjaka, udio oranica i gustoća populacije imaju negativan predznak. Ovo ukazuje da s povećanjem dobi jedinke raste vjerojatnost da će jedinka u populaciji biti pozitivna na bolest Aujeszkog. S druge strane, što je manji udio travnjaka i oranica i što je niža gustoća populacije divlje svinje to je veća vjerojatnost da će jedinke u populaciji biti negativne na bolest Aujeszkog.

6. Rasprava

Promatramo li sa stajališta stočarske proizvodnje bolest Aujeszkog ubraja se među ekonomski najznačajnije bolesti svinja (MÜLLER i sur., 2011.). Pri tome treba imati na umu kako su svinje jedini prirodni domaćini koji šire virus ove bolesti. Ostali sisavci predstavljaju slijepu ulicu s obzirom na to da je u njih infekcija u pravilu smrtonosna te uginuće može nastupiti i prije negoli uopće dođe do izlučivanja uzročnika. U slučaju divljih životinja, smrtnost u populaciji divljih svinja ekonomski gledano i ne predstavlja poseban problem s obzirom na ionako izrazito veliku populaciju na većem dijelu Europe. Ono što prema pojedinim autorima može zabrinjavati jest potencijalni rizik za ugrožene vrste mesojeda poput primjerice medvjeda (*Ursus arctos*), risa (*Lynx lynx*), sivog (*Canis lupus*) i iberijskog vuka (*Canis lupus signatus*). Ove vrste, kada je riječ o divljim svinjama, jedu pretežito lešine, ali povremeno mogu uloviti i konzumirati manje jedinke, poglavito prasad i nazimad. Iako je rizik očigledno prisutan, opisi zaraze divljih mesojeda su rijetki, i svode se pretežito na jedinke držane u zatočeništvu (ZANIN i sur., 1997., BANKS i sur., 1999.). Premda ovaj podatak zvuči neobično s obzirom na utvrđenu seroprevalenciju kod divljih svinja, treba istaknuti kako je mogućnost pronalaska lešine mesojeda na slabo pristupačnom, uglavnom brdskom ili gorskom staništu razmjerno mala, a da su procesi raspadanja lešine ljeti izrazito brzi. Drugim riječima, činjenica da prijenos virusa bolesti Aujeszkoga na divlje mesojede u slobodnoj prirodi nije zabilježen ne znači istodobno i da ga doista i nema. Pored ovoga, kako je prethodno spomenuto, prisutnost virusa u populaciji divljih svinja predstavlja prijetnju i za lovačke pse (KEROS i sur., 2015.).

Virus se u populaciji divljih svinja primarno širi zrakom i spolnim putem (ROMERO i sur., 2001.). U dostupnoj literaturi se spominje i mogućnost prijenosa virusa putem konzumacije lešina divljih svinja (HAHN i sur., 1997.). Ovdje treba svakako navesti kako ova pretpostavka znanstveno nije potvrđena s obzirom da divlje svinje nerado jedu lešine svojih istovrsnika (PROBST i sur., 2017.). U svakom slučaju, virus se širi primarno bliskim kontaktom, za što su uvjeti života u krdu izrazito povoljni.

Serološka istraživanja u Europi utvrdila su različite prevalencije protutijela na virus bolesti Aujeszzkoga u divljih svinja, od izrazito niske do vrlo visoke. Ovakve varijacije između ostaloga ovise o načinu uzgoja, spolu i dobnim kategorijama. Tako su primjerice znanstvenici na jugu Italije utvrdili prevalenciju od 7,9 %, a na njenom sjeveru od 9,98 % u prirodnom uzgoju, te čak do 65,58 % u svinja držanih u gateru (MONTAGNARO i sur., 2011., CARUSO i sur., 2019.). VENGUŠT i sur. (2006.) su na području susjedne Slovenije na uzorku od 178 divljih svinja utvrdili prevalenciju od 31 %, dok su GORTÁZAR i sur. (2002.) na području Španjolske tijekom jedne epizootije ove bolesti utvrdili prevalenciju od 56 %. Također u Španjolskoj, RUIZ-FONS i sur. (2008.) utvrdili su seroprevalenciju od 36,63 %. U Republici Hrvatskoj ŽUPANČIĆ i sur. (2002.) utvrdili su prevalenciju od 54,54 % u divljih svinja s Moslavačke gore. U tom su istraživanju uzorci prikupljeni uglavnom od prasadi, uz tek tri uzorka krvi veprova i jednog uzorka podrijetlom od krmače. Također, iako se u radu ne navodi specifično podrijetlo svinja, s obzirom na udio najmlađih kategorija i visoku seroprevalenciju među njima lako je moguće da su predmetna grla uzgojena u ograđenom prostoru. S druge strane, na uzorku odstrijeljenih divljih krmača u

Španjolskoj RUIZ-FONS i sur. (2006.) utvrdili su prevalenciju pozitivnih od čak $60,6 \pm 0,06$ %. U ovom istraživanju utvrđena je ukupna prevalencija od 33 % (75/222), što je u suglasju s prevalencijom utvrđenom na području susjedne Republike Slovenije (n = 178) i Španjolske (n = 1714) (VENGUŠT i sur., 2006., RUIZ-FONS i sur., 2008.). Pri tome je značajno napomenuti kako je najveći postotak pozitivnih utvrđen u kategoriji grla starijih od 2 godine (P = 65,7 %). Nalaz pozitivnih krmača od 65,3 %, gledano isključivo u kategoriji ženki sličan je nalazu RUIZ-FONS i sur. (2006.). Zanimljiv nalaz predstavlja činjenica da je prevalencija daleko viša (statistički znakovita razlika) na području Sisačko-moslavačke županije u odnosu na Zagrebačku i Osječko-baranjsku županiju. Ovakav nalaz govori o regionalnim razlikama u seroprevalenciji na području Republike Hrvatske.

Kada promatramo bolest Aujeszzkoga u populaciji divljih svinja treba voditi računa o posebnosti života ove vrste i prije svega o društvenom uređenju i potencijalnim migracijama. Pri tome, odrasle krmače, prasad i nazimad tvore povezano krdo, a mladi mužjaci po navršetku druge godine života pod pritiskom odraslih krmača moraju napustiti porodično krdo. Oni tada formiraju manje skupine, koje čine uglavnom od pet do šest jedinki (JANICKI i sur., 2007.). Nakon određenoga vremena i ta se krda rasformiraju te mužjaci postaju samotnjaci koji se približavaju ženkama samo u vrijeme parenja. Prema tome, sasvim je razvidno kako je divlja svinja društvena vrsta s jakim postnatalnim vezama između majki i kćeri, koje u pravilu traju i po nekoliko godina. Tijekom godine javljaju se kolebanja unutar skupina koja uglavnom ovise o rasplodnom statusu (KAMINSKI i sur., 2005.). Stoga su migraciji (disperziji) skloniji muški potomci, a društvene

skupine u pravilu tvore filopatrijske krmače, koje su međusobno u bliskom srodstvu (STUBBE i STUBBE, 1977., TRUVÉ i LEMEL, 2003., KAMINSKI i sur., 2005.). Kako je u ovom uzorku utvrđena prevalencija od 10 % u prasadi i 27,5 % u nazimadi uz jasnu ovisnost prevalencije o dobi svinja (Tablice 7 i 8), bilo je za očekivati znakovito višu prevalenciju na razini krda u odnosu na samotne mužjake. Posebice kada se zna da je među krmačama utvrđena visoka prevalencija čime ujedno predstavljaju rizik za prijenos virusa na mlađe dobne kategorije. Pored toga, poznato je kako virus bolesti Aujeszkoga može stvoriti trajne (latentne) infekcije smještajući se primarno u stanicama živčanog sustava (ALEMAÑ i sur., 2001.), što uz mogućnost reaktivacije i ponovnog izlučivanja virusa osigurava održavanje virusa u predmetnom krdu (HOWARTH, 1969., DAVIES i BERAN, 1981.). Ovaj je podatak iznimno značajan u proučavanju epizootologije bolesti Aujeszkoga u divljih svinja s obzirom na to da navedena društvena struktura krda osigurava održavanje virusa i njegov prijenos na mladunčad putem bliskoga kontakta. Ipak, s druge strane, ovakav način života donekle umanjuje utjecaj gustoće populacije na dobar dio bolesti s obzirom na to da se različita krda nerado međusobno miješaju pa samim time imaju manju ulogu u prijenosu bolesti na druge skupine. U tom je smislu, za razumijevanje epizootologije različitih bolesti slobodnoživućih divljih svinja, potrebno utvrditi poveznicu između različitih krda u smislu širenja i održavanja infekcije. Na nivou krda, u ovom je istraživanju utvrđena prevalencija od 29,79 %, iako treba uzeti u obzir i moguće greške u procjeni dobi koje remete točnost ovoga rezultata. Isto tako, utvrđeno je i kako prevalencija raste s porastom dobi svinja. Zbog toga je

neophodno razmotriti i potencijalne čimbenike koji mogu dovesti do aktivacije virusa u prije zaraženim divljim svinjama.

Prethodno je navedeno kako se latentne infekcije mogu aktivirati i to poglavito pod utjecajem imunosupresije ili odgovarajućeg stresa. Jedna potencijalna stresna situacija u životu divljih svinja je sezona parenja, razdoblje u kojem dolazi do porasta aktivnosti nusbubrežne žlijezde i povišenja koncentracije kortizola u krvi (EGGERMANN i sur., 2013.). Ovdje se nikako ne smije zaboraviti niti činjenica da u tom razdoblju dolazi do priključivanja inače samotnih mužjaka krdu. U to vrijeme mužjaci imaju povišene razine testosterona i skloni su sukobima s drugim veprovima, što predstavlja dodatni stres, a ujedno je povezan i sa smanjenim uzimanjem hrane. Također, sezona bucanja poklapa se i s većim dijelom lovne sezone u kojoj prevladavaju skupni lovovi prigonom, a upravo oni su već potvrđeni izvor stresa u divljih svinja (GÜLDENPFENNING i sur., 2020.). Dodatno, u to se vrijeme javlja i povećana migracija divljih svinja tijekom jeseni i zime koja se objašnjava povišenom aktivnošću zbog parenja, duljim razdobljima noći i sezonom lova (PRIMI i sur., 2010., LAGOS i sur., 2012.). Konačno, utjecaj stresa uzrokovan parenjem i lovnom sezonom i prije je naglašavan kao bitan čimbenik u širenju virusa bolesti Aujeszzkoga (ROSSI i sur., 2005., VICENTE i sur., 2005., ROMERO i sur., 2011.). U ovom su istraživanju, između ostaloga, utvrđene dvije epizootiološki gledano važne činjenice, porast prevalencije s dobi svinja i gotovo jednaka prevalencija u odraslih mužjaka i ženki. Ovo nam govori kako je primaran prijenos uzročnika tijekom sezone parenja, a manje izravnim kontaktom u krdu. Pored toga, ovaj nam podatak ukazuje i da su infekcije unutar krda uglavnom latentne naravi. Ovo potvrđuje i

činjenica da je broj lovačkih pasa koji obole od ove bolesti razmjerno nizak (pojedinačan), iako bi visoka seroprevalencija i navada pasa da grizu odstrijeljene i ranjene svinje trebala dati i višu pojavu bolesti u pasa. Pored navedenoga treba istaknuti kako se u posljednje vrijeme uslijed promjena u staništu, kao i zahvaljujući narušenoj spolnoj i dobnoj strukturi divljih svinja promijenila i sezona parenja. Tako se prema nekim istraživanjima divlja svinja kod nas pari cijelu godinu, s manjim oscilacijama (LOLIĆ, 2015.). Pored toga, viša populacija svinja uvjetuje i produljenje lovnih aktivnosti na cijelu godinu (VUJNOVIĆ, 2016., TOMORAD, 2017., MILAS, 2018.). Ove dvije činjenice ukazuju na mogući porast seroprevalencije u budućnosti. Dodatno treba istaknuti da između panonskog i dinarskog područja postoji izražena razlika u dinamici lova. Tako se u državnim lovištima panonskoga dijela Hrvatske (lovišta s udjelom šuma od preko 50 %) ova divljač tijekom jeseni i zime uglavnom lovi skupnim lovovima, a u dinarskom području uglavnom pojedinačnim. Stres i rastjerivanje (disperzija) divljih svinja su razumljivo viši u slučaju skupnih lovova (MAILARD i FOURNIER, 1995.), što treba imati na umu pri budućim istraživanjima ove bolesti.

Iz navedenoga, i utvrđene visoke prevalencije protutijela u odraslih mužjaka, veprove treba istaknuti kao potencijalnu epizootiološku vezu među različitim krdoma koja osigurava prijenos virusa u druge skupine divljih svinja i njegovo održavanje u prirodi. Na razini krda omjer izgleda pokazuje veću vjerojatnost nalaza pozitivnih ženki, pri čemu je u kategoriji prasadi ova razlika i statistički znakovita. Znatniji stres kod mladih mužjaka predstavlja protjerivanje iz krda od strane krmača, a koje se događa s navršene dvije godine života. Nakon

toga, prevalencija protutijela na bolest Aujeszzkoga u mužjaka i ženki je gotovo identična.

Promatramo li korištenje staništa od strane divljih svinja možemo doći do dodatnih zaključaka glede prijenosa bolesti na veće udaljenosti. Tako je primjerice prostorni raspored vrsta pod velikim utjecajem klimatskih čimbenika, koji mogu u potpunosti ograničiti područje obitavanja ili pak prisiliti jedinke da pojedine dijelove teritorija koriste isključivo sezonski. Jedan od pokazatelja koji potvrđuju takvo korištenje staništa je i sezonalnost prelaska preko prometnica (CLEVENGER i sur., 2013.). Pored toga areal kretanja životinja je u pravilu veći ljeti, a manji zimi. Tako se sredinom 20. stoljeća u znanstvenim krugovima uvriježilo mišljenje kako je glavni ograničavajući čimbenik širenja ove vrste na sjever Europe upravo dubina snijega (BRIEDERMANN, 2009.), budući da se tadašnja sjeverna granica njena areala poklapala s izolinijom dubine snijega od 30 do 40, iznimno 50 cm. Stoga BRIEDERMANN (2009.) navodi kako je ova vrsta u Finsku dospjela 50-ih godina 20. stoljeća iz Rusije, čime se ujedno ukazuje da je uvjet pomaka sjeverne granice areala divlje svinje uz snijeg i gospodarenje, odnosno lovostaja i prihrana. Upravo snijeg i prihrana krepkim krmivima može i biti razlog povećane aktivnosti divlje svinje tijekom razdoblja listopad-prosinac. Prema HELL i sur. (1984.) optimalne klimatske prilike za ovu divljač su do 400 m nadmorske visine, no ona se cijele godine zadržava i na nadmorskim visinama do 800 m, a tijekom ljeta i na većim visinama. Pored navedenoga, za gustoću populacije od presudnog je značaja i tip šumskih sastojina (Tablica 11.), jer je najveća gustoća populacije na području Slovačke zabilježena u sastojinama

hrasta (*Quercus* spp.) i obične bukve (*Fagus sylvatica*), a najmanja u sastojinama smreke (*Picea* spp.).

Tablica 11. Ovisnost relativne odstrelne kvote divlje svinje o tipu šumskih sastojina i udjelu šumskih površina u lovištima Slovačke u razdoblju 1978.-1980.

TIPOVI ŠUMSKIH SASTOJINA	RELATIVNA ODSTRJELNA KVOTA (grla/1 000 ha)	OPTIMALAN UDIO ŠUMSKIH POVRŠINA (%)	RASPON RELATIVNE ODSTRELNE KVOTE
Hrastovi	4,21	83 – 90	0,15-10,75
Bukva i hrast	3,73	72 – 82	0,15-8,61
Bukove šume istočne Slovačke	1,90	30 – 37	0,09-6,48
Bukva i smreka	2,03	55-65	0,05-8,94
Smreka	1,33	35-55	0,07-5,13
Borove šume zapadne Slovačke	2,38	90-100	0,09-6,30
Poplavne šume	5,22	90-100	0,14-15,11

STUBBE i sur. (1989.) navode kako se u poljoprivrednim područjima divlja svinja uglavnom zadržava u poljima pod kukuruzom, čak do žetve, a nakon toga se najčešće ne vraćaju u prvotna prebivališta nego traže nova područja. U dobi od 4 na više godina veprovi pokazuju tendenciju smanjenja veličine životnoga

prostora. Razlog tomu jest što stariji veprovi bolje poznaju prvotno područje obitavanja, a s porastom dobi postaju oprezniji i tako se na manjoj ploštini životnoga prostora osjećaju sigurnije. Iako mušjaci mogu otići i 17 km od mjesta gdje su obilježeni, ova udaljenost dosta ovisi o strukturi staništa tako da je životni prostor divlje svinje čak i unutar jedne regije dosta varijabilan. Ženska grla uglavnom su vjernija području gdje su i oprasena. Naime, 65 % nazimica odstrijeljeno je u područjima na kojima su i obilježena. U dobi od 2 godine na dalje krmače više ne pokazuju tendenciju širenja životnog prostora i zadržavaju se u području promjera 6 km. Ako je prasenje bilo tijekom zime tada je najveća disperzija grla tijekom zime 3. godine oprasenih jedinki (siječanj-ožujak), a ona može iznositi i preko 20 km.

Prema MELIS i sur. (2006.) čimbenici koji imaju učinak na brojnost divlje svinje u slobodnoj prirodi su prvenstveno jake zime, na način da prosječna temperatura zraka u siječnju negativno utječe na gustoću populacije divlje svinje. Za niskih temperatura tlo je smrznuto ili pokriveno debelim snijegom što jedinkama otežava rovanje, odnosno pristup beskralježnjacima i podzemnim dijelovima biljaka. Stoga je prostorna varijabilnost u gustoći populacije u najvećoj mjeri uvjetovana prosječnim temperaturama zraka u siječnju, a manje produktivnošću biljaka.

Na pravce i opsege disperzije sa stajališta staništa utječe nekoliko čimbenika kao što su: gustoća populacije, struktura i kvaliteta staništa te klimatske značajke prostora (DEXTER, 1999., MARKOV i sur., 2004., MAYER, 2009., SCHLICHTING i sur., 2016.). U ovom istraživanju modeli su pokazali kako jedino dob pokazuje pozitivan predznak, odnosno ukazuje da vjerojatnost nalaza

pozitivnog grla raste s dobi jedinke. Također, udio površina pod šumom ima pozitivan, ali daleko slabiji koeficijent. On nam govori kako je veći udio šuma povezan s većom vjerojatnošću nalaza pozitivnih grla primarno zbog više kvalitete staništa, odnosno boljeg bonitetnog razreda i samim time veće gustoće populacije divljih svinja. S druge strane, negativan predznak šikara, travnjaka i oranica ukazuje na činjenicu da će manje pogodno stanište utjecati na veću disperziju grla i samim time potencijalni prijenos uzročnika na udaljenija područja. Također ne treba isključiti niti utjecaj lošijeg staništa na lučenje kortizola. Modelima je utvrđen i snažan negativan predznak gustoće populacije koji nam govori kako s manjom gustoćom populacije svinja sa sigurnošću možemo govoriti o većem udjelu serološki negativnih svinja. Nasuprot tome, veća gustoća populacije nije pokazala i proporcionalni porast postotka pozitivnih grla. U svojim istraživanjima RUIZ-FONS i sur. (2008.) nisu utvrdili povezanost između prevalencije protutijela na bolest Aujeszzkoga u divljih svinja i staništa, kao niti povezanost s nalazom u domaćih svinja. Nasuprot tome, utvrdili su identičan obrazac vezan uz dob, kao i u ovom istraživanju. Molekularnim pretragama nije potvrđena prisutnost virusa u pretraživanim uzorcima.

7. Zaključci

- Utvrđena je prosječna prevalencija od 33,78 % što odgovara nalazima u susjednoj Sloveniji.
- Seroprevalencija je ovisna o geografskom području i načinu uzgoja, a raste s dobi svinja.
- Gledano prema spolu seroprevalencija je viša u ženki ukupno, a gotovo jednaka ako se promatraju grla starija od dvije godine.
- Veprovi predstavljaju bitan čimbenik u prijenosu bolesti, kao i sezona parenja i lova.
- Dobiveni podatci ukazuju na mogućnost da je infekcija virusom Aujeszzkoga pretežito latentne naravi u divljih svinja.
- Porastom gustoće populacije svinja nije utvrđen i statistički znakovit porast prevalencije.
- Pozitivan utjecaj na prevalenciju ima viši udio šuma u staništu.
- PCR pretragama nije izdvojen virus bolesti Aujeszzkoga.

8. Popis literature

ACEVEDO, P., J. VICENTE, U. HÖFLE, J. CASSINELLO, F. RUIZ-FONS, C. GORTAZAR (2007): Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiol. Infect.* 135, 519–527.

ALBINA, E., A. MESPLÈDE, G. CHENUT, M. F. LE POTIER, G. BOURBAO, S. LE GAL, Y. LEFORBAN (2000): A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet. Microbiol.* 77, 43-57.

ALEMAÑ, N., M. I. QUIROGA, M. LÓPEZ-PEÑA, S. VÁZQUEZ, F. H. GUERRERO, J. M. NIETO (2001): Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J. Virol.* 75, 469-479.

ALEXANDRI, P., A. TRIANTAFYLLIDIS, S. PAPAKOSTAS, E. CHATZINIKOS, P. PLATIS, N. PAPAGEORGIU, G. LARSON, T. J. ABATZOPOULOS, C. TRIANTAPHYLLIDIS (2012): The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. *J. Biogeogr.* 39, 713–723.

ANONYMUS (2018): Statistički ljetopis Republike Hrvatske. Državni zavod za statistiku, Zagreb.

BANKS, M., L. S. MONSALVE TORRACA, A. G. GREENWOOD, D, C. TAYLOR (1999.): Aujeszky's disease in captive bears. Vet. Rec. 145, 362-365.

BOADELLA, M., C. GORTÁZAR, J. VICENTE, F. RUIZ-FONS (2012): Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs? BMC Vet. Res. 8:7.

BOADELLA, M., J. VICENTE, F. RUIZ-FONS, J. DE LA FUENTE, C. GORTAZAR (2012): Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. Prev. Vet. Med. 107, 214–221.

BOROWIK, T., T. CORNULIER AND B. JEDRZEJEWSKA (2013): Environmental factors shaping ungulate abundance in Poland. Acta Theriol 58:403–413.

BRIEDERMANN, L. (2009): Schwarzwild – Neuausgabe bearbeitet von Burkhard Stöcker. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart, 596 pp.

BROWN, T. T., K. O. KWANG, AND F. J. FULLER. 1995. Detection of pseudorabies viral DNA in tonsillar epithelial cells of latently infected pigs. Am. J. Vet. Res. 56, 587–594.

CAHILL, S., F. LIMONA, J. GRACIA (2003): Spacing and nocturnal activity of wild boar *Sus scrofa* in a Mediterranean metropolitan park. *Wildl. Biol.* 9, 13–33.

CANO-MANUEL, F. J., J. LÓPEZ-OLVERA, P. FANDOS, R. C. SORIGUER, J. M. PÉREZ, J. E. GRANADOS (2014): Long-term monitoring of ten selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Vet. Microbiol.* 174, 148-154.

CARUSO, C., N. VITALE, R. PRATO, M. C. RADAELLI, S. ZOPPI, R. POSSIDENTE, A. DONDO, L. CHIAVACCI, A. M. MORENO MARTIN, L. MASOERO (2019.): Pseudorabies virus in North-West Italian wild boar (*Sus scrofa*) populations: prevalence and risk factors to support a territorial risk-based surveillance. *Vet. Ital.* 54, 337-341.

CASADES-MARTÍ, L., D. GONZÁLEZ-BARRIO, L. ROYO-HERNÁNDEZ, I. DÍEZ DELGADO, F. RUIZ-FONS (2020): Dynamics of Aujeszky's disease virus infection in wild boar in enzootic scenarios. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 388–405.

CELLINA, S., (2008): Effects of Supplemental Feeding on the Body Condition and Reproductive State of Wild Boar *Sus scrofa* in Luxembourg. Dissertation. University of Sussex, UK.

CHRISTENSEN, L. S., J. MOUSING, S. MORTENSEN, K. J. SOERENSEN, S. B. STRANDBYGAARD, C. A. HENRIKSEN, J. B. ANDERSEN, (1990.): Evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet Rec. 127, 471-474.

CHRISTENSEN, L. S., S. MORTENSEN, A. BØTNER, B. S. STRANDBYGAARD, L. RØNSHOLT, C. A. HENRIKSEN, J. B. ANDERSEN (1993.): Further evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet Rec. 132, 317-321.

CLEVENGER, A. P., B. DORSEY, M. BARRUETO, A. T. FORD (2013): Activity patterns of wildlife at crossing structures as measure of adaptability and performance. Proceedings of the 2013 International Conference on Ecology and Transportation (ICOET 2013). http://www.icoet.net/icoet_2013.

CLOSA-SEBASTIA, F., E. CASAS-DIAZ, R. CUENCA, S. LAVIN, G. MENTABERRE, I. MARCO (2011): Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). Eur. J. Wildl. Res. 57, 977–981.

CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Školska knjiga.

DARABUŠ, S., I. Z. JAKELIĆ (1996): Osnove lovstva, I izdanje. Hrvatski lovački savez, Zagreb, 1996, 97-100.

DAVIES, E. B., G. W. BERAN (1981): Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 31, 32-36.

DEKKERS, L., A. ELBERS (2000): Serosurveillance of notifiable veterinary diseases in wild boar in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 125, 2-4.

DELGADO, F. RUIZ-FONS (2020): Dynamics of Aujeszky's disease virus infection in wild boar in enzootic scenarios. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 388-405.

DEXTER, N. (1999): The influence of pasture distribution, temperature and sex on home-range size of feral pigs in a semi-arid environment. *Wildl. Res.* 26, 755-762.

EGGERMANN, J., J. THEUERKAUF, B. PIRGA, A. MILANOWSKI, R. GULA (2013): Stress-hormone levels of wolves in relation to breeding season, pack size, human activity, and prey density. *Ann. Zool. Fennici* 50, 170-175.

ELBERS, A., L. DEKKERS, J. VAN DER GIESSEN (2000): Sero-surveillance of wild boar in the Netherlands, 1996-1999. *OIE Rev. Sci. Tech.* 19, 848-854

ELBERS, A., L. DEKKERS, G. SPEK, L. STEINBUSCH, A. VAN EXSEL (2001): Sero-monitoring of notifiable diseases in wild boar in the Netherlands 1999-2001. Tijdschr. Diergeneeskd. 126, 779–781.

ERKINARO, E., K. HEIKURA, E. LINDGREN, E. PULLIAINEN, S. SULKAVA, (1982): Occurrence and spread of the wild boar (*Sus scrofa*) in eastern Fennoscandia. Mem. Soc. Fauna Flora Fenn. 58, 39–47.

FONSECA, C., A. ALVES DA SILVA, J. ALVES, J. VINGADA, A. M. V. M. SOARES (2011): Reproductive performance of wild boar females in Portugal. Eur. J. Wildl. Res. 57, 363–371.

GEISSER, H., H.-U. REYER (2005): The influence of food and temperature on population density of wild boar *Sus scrofa* in the Thurgau (Switzerland). J. Zool. Lond. 267, 89–96.

GENOV, P. (1981): Significance of natural biocenoses and agrocenoses as the source of food for wild boar (*Sus scrofa* L.). Ekol. Pol. 29, 117–136.

GETHÖFFER, F., G. SODEIKAT AND K. POHLMAYER (2007): Reproductive parameters of wild boar (*Sus scrofa*) in three different parts of Germany. Eur. J. Wildl. Res. 53, 287–297.

GORTAZAR, C., J. VICENTE, Y. FIERRO, L. LEON, M. J. CUBERO, M. GONZALEZ, (2002): Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 969, 210–212.

GÜLDENPFENNIG, J., M. SCHMICKE, M. HOEDEMAKER, U. SIEBERT, O. KEULING (2020): An approach to stress assessment during hunting: Cortisol levels of wild boar (*Sus scrofa*) during drive hunts. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.987628>

HAHN, E. C., G. R. PAGE, P. S. HAHN, K. D. GILLIS, C. ROMERO, J. A. ANNELLI, E. P. J. GIBBS (1997): Mechanisms of transmission of Aujeszky's disease virus originating from feral swine in the USA. *Vet. Microbiol.* 55, 123-130.

HELL, P., M. HRNČIAR, M. ŠIMIÁK (1984): Distribution and territorial planning of wild boar (*Sus scrofa* L.) in Slovakia (in Slovak with English summary). *Folia venatoria* 14, 71-88.

HEWITT, G. M. (1999): Post-glacial recolonization of Europe. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 87–112.

HEWITT, G. M. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.

HOWARTH, J. A. (1969): A serologic study of pseudorabies in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 154, 1583-1589.

JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

JANSEN A., E. LUGE, B. GUERRA, P. WITTSCHEN, A.D. GRUBER, C. LODDENKEMPER, T. SCHNEIDER, M. LIERZ, D. EHLERT, B. APPEL, K. STARK, K. NÖCKLER (2007): Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. Emerg. Infect. Dis. 13, 739–742.

JEMERŠIĆ, L., J. PRPIĆ, B. ROIĆ, D. ŽELJEŽIĆ, T. KEROS, (2019). Divlja svinja (*Sus scrofa*) – žrtva i saveznik najznačajnijih virusnih infekcija u Europi. Vet. stn. 50, 137-148.

JEMERŠIĆ, L., T. KEROS, J. PRPIĆ, B. ROIĆ, D. DEŽĐEK, S. TERZIĆ, D. BRNIĆ, T. BEDEKOVIĆ (2012): The first report of Pseudorabies virus (PRV) DNA detection in wild boars in Croatia. Book of Abstracts 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Primošten, 26.-30. September 2012, str. 97-98.

JERINA, K., B. POKORNY, M. STERGAR (2014): First evidence of long-distance dispersal of adult female wild boar (*Sus scrofa*) with piglets. Eur. J. Wildl. Res. 60, 367–370.

KAMINSKI, G., S. BRANDT, E. BAUBET, C. BAUDOIN (2005): Life-history patterns in female wild boars (*Sus scrofa*): mother-daughter postweaning associations. Can. J. Zool. 83, 474–480.

KEROS, T., D. BRNIĆ, J. PRPIĆ, D. DEŽDEK, L. JEMERŠIĆ, B. ROIĆ, T. BEDEKOVIĆ (2014): Characterisation of pseudorabies virus in domestic pigs and wild boars in Croatia. Acta Vet. Hung. 62, 512-519.

KEROS, T., L. JEMERŠIĆ, D. BRNIĆ, J. PRPIĆ, D. DEŽDEK (2015): Pseudorabies in hunting dogs in Croatia with phylogenetic analysis of detected strains. Vet. Rec. Case Rep. 1, e000181-1-e000181.

KLUGE, J. P., G. W. BERAN, H. T. HILL, K. B. PLATT (1999): Pseudorabies. In: Diseases of swine, 8th Edition (Straw, B. E., S. D'allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, eds.). Ames, Iowa State University Press, pp. 233-246.

KONJEVIĆ, D., (2005): Divlja svinja (*Sus scrofa* L.) – od biologije do kuhinje. Meso, 7, 49–53.

KÖPPEL, C., L. KNOPF, M. P. RYSER, R. MISEREZ, B. THÜR, K. D. C. STÄRK (2007): Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 212–220.

LARI, A., D. LORENZI, D. NIGRELLI, E. BROCCHI, S. FACCINI, A. POLI (2006): Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy. *J. Wildl. Dis.* 42, 319–324.

LEUENBERGER, R., P. BOUJON, B. THÜR, R. MISEREZ, B. GARIN-BASTUJI, J. RÜFENACHT, K. D. C. STÄRK (2007): Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Vet. Rec.* 160, 362–368.

LINDBERG, A. (2018): Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden 2018. National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. SVA:s rapportserie 56 ISSN 1654-7098.

LIPOWSKI, A., A. SZSZOTKA-BOCHNIARZ, Z. PEJSAK (2017): Prevalence of antibodies to Aujeszky's disease virus in wild boar in Poland, between 2011 and 2014: a retrospective study. *J. Vet. Res.* 61, 397-404.

LOLIĆ, N. (2015): Body and trophy growing patterns of wild boar (*Sus scrofa*) from the southern part of Medvednica (In Croatian). Master thesis. University of Zagreb, Faculty of Forestry, 44 pp.

MAILLARD, D., P. FOURNIER (1995): Effect of shooting with hounds on home range size of wild boar (*Sus scrofa* L.) groups in Mediterranean habitat. *Ibex J. Mt. Ecol.* 3, 102–107.

MARKOV, N. I., N. D. NEIFEL'D, A. A. ESTAF'EV (2004): Ecological aspects of dispersal of the wild boar, *Sus scrofa* L., 1758, in the northeast of European Russia. *Russ. J. Ecol.* 35, 131–134.

MASSEI, G., J. KINDBERG, A. LICOPPE, D. GAČIĆ, N. ŠPREM, J. KAMLER, E. BAUBET, U. HOHMANN, A. MONACO, J. OZOLINŠ, S. CELLINA, T. PODGÓRSKI, C. FONSECA, N. MARKOV, B. POKORNY, C. ROSELL, A. NÁHLIK (2014): Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe (wileyonlinelibrary.com). doi 10.1002/ps.3965.

MAYER, J. J. (2009): Wild pig behavior. In: *Wild pigs: biology, damage, control techniques, and management* (Mayer, J. J., I. L. Jr. Brisbin, eds). Savannah River National Laboratory SRNL-RP-2009- 00869, Aiken, South Carolina, USA, pp. 77–104.

MCGEOCH, D. J., S. COOK (1994): Molecular phylogeny of the alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale. *J. Mol. Biol.* 238, 9-22.

MEIER, R. K., F. RUIS-FONS, M. P. RYSER-DEGIORGIS (2015): A picture of trends in Aujeszky's disease virus exposure in wild boar in the Swiss and European contexts. BMC Vet. Res. 11, 277.

MELIS, C., A. SZAFRAŃSKA, B. JĘDRZEJEWSKA, K. BARTOŃ (2006): Biogeographical variation in the population density of wild boar (*Sus scrofa*) in western Eurasia. J. Biogeogr. 33, 803-811.

METTENLEITER, T. C. (2000): Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-State of the art, June 1999. Vet. Res. 31, 99-115.

METTENLEITER, T. C., B. EHLERS, T. MÜLLER, K. J. YOON, & J. P. TEIFKE (2012): Herpesviruses. In: Disease of Swine, 10th edn. (Zimmerman, J. J., L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, eds.). Wiley-Blackwell, UK, pp. 421–446.

MILAS, T. (2018): Trophy quality of wild boar tusks in west and south part of Croatia during eight hunting years. (In Croatian). Master thesis. University of Zagreb, Faculty of Forestry, 43 pp.

MONROE, W. E. (1989.): Clinical signs associated with pseudorabies in dogs. JAVMA 195, 599–602.

MONTAGNARO, S., S. SASSO, L. DE MARTINO, M. LONGO, V. IOVANE, G. GHIURMINO, G. PISANELLI, D. NAVA, L. BALDI, U. PAGNINI (2011): Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania region, Italy. *J. Wildl. Dis.* 46, 316–319.

MÜLLER, T., J. TEUFFERT, R. ZELLMER, F. CONRATHS (2001): Experimental infection of European wild boars and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence. *Am. J. Vet. Res.* 62, 252–258.

MÜLLER, T., E. C. HAHN, F. TOTTEWITZ, M. KRAMER, B. G. KLUPP, T. C. METTENLEITER, C. FREULING (2011): Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Arch. Virol.* 156, 1691–1705.

PEJSAK, Z. K., M. J. TRUSZCZYNSKI (2006): Aujeszky's disease (pseudorabies). In: *Diseases of swine*, 9th edn. (Straww, B. E., J. J. Zimmerman, S. D'allaire, D. J. Taylor, eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 419–433.

PITTIGLIO, C., S. KHOMENKO, D. BELTRAN-ALCRUDO (2018): Wild boar mapping using population-density statistics: From polygons to high resolution raster maps. *PLoS ONE* 13(5): e0193295.

POMERANZ, L., A. E. REYNOLDS, C. J. HENGARTNER (2005): Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 462–500.

PROBST, C., A. GLOBIG, B. KNOLL, F. J. CONRATHS, K. DEPNER (2017): Behaviour of free ranging wild boar towards their dead fellows: potential implications for the transmission of African swine fever. *R. Soc. Open Sci.* 4(5), 170054.

ROIĆ B., L. JEMERŠIĆ, S. TERZIĆ, T. KEROS, J. BALATINAC, T. FLORIJANČIĆ (2012): Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005–2006 and 2009–2010. *J. Wildl. Dis.* 48, 131–137.

ROIĆ, B., S. ČAJAVEC, J. TONČIĆ, J. MADIĆ, Z. LIPEJ, L. JEMERŠIĆ, M. LOJKIĆ, Ž. MIHALJEVIĆ, Ž. ČAČ, B. ŠOŠTARIĆ (2005): Prevalence of Antibodies to Porcine Parvovirus in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Croatia. *J. Wildl. Dis.* 41, 796-799.

ROIĆ, B., S. ČAJAVEC, J. TONČIĆ, J. MADIĆ, Z. LIPEJ, Ž. MIHALJEVIĆ, L. JEMERŠIĆ, M. LOJKIĆ, Ž. ČAČ, B. ŠOŠTARIĆ (2006): Serological evaluation for porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa* L.) in Croatia. *Praxis vet.* 54, 51-59.

ROMERO, C. H., P. N. MEADE, J. E. SHULTZ, H. Y. CHUNG, E. P. GIBBS, E. C. HAHN, G. LOLLIS (2001): Venereal transmission of pseudorabies viruses indigenous to feral swine. *J. Wildl. Dis.* 37, 289-296.

ROMERO, C. H., P. N. MEADE, B. L. HOMER, J. E. SHULTZ, G. LOLLIS, (2003): Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. *J. Wildl. Dis.* 39, 567–575.

ROSSI, S., J. HARS, B. GARIN-BASTUJI, M. LE POTIER, P. BOIREAU, P. AUBRY, A. M. HATTENBERGER, Y. LOUGUET, B. TOMA, F. BOUE (2008): Résultats de l'enquête nationale sérologique menée chez le sanglier sauvage (2000-2004). *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 29, 7.

RUIZ-FONS, F., J. VICENTE, D. VIDAL, U. HÖFLE, D. VILLANÚA, C. GAUSS, U. HÖFLE, D. VILLANÚA, C. GAUSS, J. SEGALÉS, S. ALMERÍA, V. MONTORO, C. GORTÁZAR (2006): Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenol.* 65, 731–743.

RUIZ-FONS, F., D. VIDAL, U. HOFLE, J. VICENTE, C. GORTÁZAR (2007): Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Vet. Microbiol.* 120, 241–250.

RUIZ-FONS, F., D. VIDAL, J. VICENTE, P. ACEVEDO, I. G. FERNÁNDEZ-DE-MERA, V. MONTORO, C. GORTÁZAR (2008): Epidemiological risk factors of Aujeszky's disease in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs in Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 549-555.

RUIZ-FONS, F. (2017): A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: Changes modulating the risk of transmission to humans. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 68–88.

SÁEZ-ROYUELA, C., J. L. TELLERÍA (1986.): The increased population of wild boar (*Sus scrofa*) in Europa. *Mammal. Review.* 16, 97–101.

SCANDURA, M., L. IACOLINA, M. APOLLONIO (2011): Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. *Mammal. Rev.* 41, 125-137.

SCHLICHTING, P. E., S. FRITTS, J. J. MAYER, PH. S. GIPSON, C. B. DABBERT (2016): Determinants of Variation in Home Range of Wild Pigs. *Wildl. Soc. Bull.* 40, 487-493.

SCHÖNIGER, S., K. KLOSE, W. WERNER, B.-A. SCHWARZ, T. MÜLLER, H.-A. SCHOON (2012): Nonsuppurative encephalitis in dogs. *Vet. Pathol.* 49, 731–734.

SCHULZE, C., A. HLINAK, P. WOHLSEIN, P. KUTZER, T. MÜLLER (2010.): Spontaneous Aujeszky's disease (pseudorabies) in European wild boars (*Sus scrofa*) in the federal state of Brandenburg, Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 123, 359-364.

SEDLAK, K., E. BARTOVA, J. MACHOVA (2008): Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. J. Wildl. Dis. 44, 777–780.

SLAVICA, A., D. KONJEVIĆ, Z. JANICKI, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, D. DEŽDEK, K. PINTUR, Ž. CVETNIĆ (2011): Divlja svinja (*Sus scrofa*) kao rezervoar opasnih zaraznih bolesti. Zbornik prispevkov 2. slovensko-hrvaškega posveta z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjadjo: divji prašič, (Poličnik, H., B. Pokorny ur.). ERICo, d.o.o., Velenje, Slovenija, str. 25-35.

STEINRIGL, A., S. REVILLA-FERNÁNDEZ, J. KOLODZIEJEK, E. WODAK, Z. BAGÓ, N. NOWOTNY, A. STEINRIGL, S. REVILLA-FERNÁNDEZ, J. KOLODZIEJEK, E. WODAK, Z. BAGÓ, N. NOWOTNY, F. SCHMOLL, J. KÖFER (2012): Detection and molecular characterization of Suid herpesvirus type 1 in Austrian wild boar and hunting dogs. Vet. Microbiol. 157, 276–284.

STILLFRIED, M., P. GRAS, K. BÖRNER, F. GÖRITZ, J. PAINER, K. RÖLLIG, M. WENZLER, H. HOFER, S. ORTMANN AND S. KRAMER-SCHADT (2017): Secrets of Success in a Landscape of Fear: Urban Wild Boar Adjust Risk Perception and Tolerate Disturbance. Front. Ecol. Evol. 5, 157.

STUBBE, W., M. STUBBE (1977): Vergleichende Beiträge zur Reproduktions- und Geburtsbiologie von Wild- und Hausschwein – *Sus scrofa* L. 1758. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 10, 153-179.

STUBBE, CH., S. MEHLITZ, R. PEUKERT, J. GORETZKI, W. STUBBE, H. MEYNHARDT (1989): Lebensraumnutzung und Populationsumsatz des Schwarzwildes in der DDR – Ergebnisse der Wildmarkierung. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 16, 212-231.

ŠPREM, N., K. SALAJPAL, T. SAFNER, D. ĐIKIĆ, J. JURIC, I. ČURIK, M. ĐIKIĆ, V. ČUBRIĆ-ČURIK (2014): Genetic analysis of hybridization between domesticated endangered pig breeds and wild boar. *Livestock Sci.* 162,1-4.

TONČIĆ, J., B. ŠOŠTARIĆ, I. VICKOVIĆ, I. TARNAJ (2006): Zdravstveno i genetičko stanje divljih svinja u Hrvatskoj. *Rad. Šumar. Inst.* 9, 223-236.

TOMORAD, V. (2017): Trophy quality of wild boar tusks in northern part of Croatia during eight hunting years. (In Croatian). Master thesis. University of Zagreb, Faculty of Forestry, 32 pp.

TRUVÉ, J., J. LEMEL (2003): Timing and distance of natal dispersal for wild boar *Sus scrofa* in Sweden. *Wildl. Biol.* 9 (Suppl), 51–57.

VENGUŠT, G., Z. VALENCAK, A. BIDOVEC (2005): Presence of antibodies against Aujeszky's disease virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Slovenia. J. Wildl. Dis. 41, 800–802.

VENGUŠT, G., Z. VALENCAK, A. BIDOVEC (2006): A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. J. Vet. Med. Ser. B-Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 24–27.

VICENTE, J., L. LEÓN-VIZCAÍNO, C. GORTÁZAR, M. J. CUBERO, M. GONZÁLEZ, P. MARTÍN- ATANCE (2002): Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. J. Wildl. Dis. 38, 649–652.

VICENTE, J., F. RUIZ-FONS, D. VIDAL, U. HÖFLE, P. ACEVEDO, D. VILLANÚA, I. G. FERNÁNDEZ-DE-MERA, M. P. MARTÍN, C. GORTÁZAR (2005): Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. Vet. Rec. 156, 408-412.

VUJNOVIĆ, Z. (2016): Trophy quality of wild boar tusks in eastern part of Croatia during last eight hunting years. (In Croatian). Master thesis. University of Zagreb, Faculty of Forestry, 46 pp.

VUTA, V., G. BARBOI, I. OLVEDI, S. NICOLAE, S. LEAU, L. ZAMFIR, D. BONCEA, I. MIHAI, A. SANDU (2009): The presence of antibodies to Aujeszky's

Disease, Bovine Viral Diarrhoea and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in wild boars. Preliminary data. *Rev. Romana Med. Vet.* 19, 75–81.

WENJUN, M. A., K. M. LAGER, J. A. RICHT, W. C. STOFFREGEN, F. ZHOU, K.-J. YOON (2008): Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 440–447.

WIDÉN, F., C. G. DAS NEVES, F. RUIZ-FONS, H. W. REID, T. KUIKEN, D. GAVIER- WIDÉN & E. F. KALETA (2012): Herpesvirus infections. In: *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*, 1st edn. (Gavier- Widén, D., J. P. Duff, A. Meredith, eds.). Wiley-Blackwell, UK, pp. 3–36.

WITTMANN, G. (1986) Aujeszky's disease *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 5, 959-977.

WITTMANN, G., V. OHLINGER, H. J. RZIHA (1983): Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch. Virol.* 75, 29–41.

ZANIN E, I. CAPUA, C. CASACCIA, A. ZUIN, A. MORESCO (1997): Isolation and characterization of Aujeszky's disease virus in captive brown bears from Italy. *J Wildl Dis.* 33, 632-634.

ZUCKERMANN, F. A. (2000): Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges, *Vet. Res.* 31, 121–131.

ŽUPANČIĆ, Ž., B. JUKIĆ, M. LOJKIĆ, Ž. ČAČ, L. JEMERŠIĆ, V. STAREŠINA (2002): Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome and bovine viral diarrhoea viruses in wild boar in Croatia. *J. Vet. Med. B-Inf. Dis. Vet. Public. Health.* 49, 253-256.

9. Životopis autora s popisom objavljenih znanstvenih radova

IME I PREZIME:

Ivica Sučec

DATUM I MJESTO ROĐENJA

29. studenoga 1980. godine, Glina, Republika Hrvatska

ŠKOLOVANJE:

1995. – 1999. – Opća gimnazija Velika Gorica

ZAPOŠLJAVANJE:

2006. – 2007. – Veterinarska stanica Velika Gorica, Sisačka ulica 39, 10410 Velika Gorica, terenski veterinar

2007. – 2017. – Ministarstvo poljoprivrede, Ulica grada Vukovara 48, 10000 Zagreb, poslovi u Upravi za veterinarstvo vezani uz kontrolu i iskorjenjivanje bolesti životinja

2017. – danas – Ministarstvo poljoprivrede, Ulica grada Vukovara 48, 10000 Zagreb, poslovi u Upravi ribarstva vezani uz EU fondove

STRUČNO USAVRŠAVANJE:

OIE, Workshop for OIE National Focal Points for Aquatic Animals, Bergen, Norveška, lipanj 2015.

Training course on Food-borne outbreaks investigation, Barcelona, Španjolska, 15. – 19. lipnja 2015.

7th Workshop for Rabies – 27. – 28. svibnja 2015., – Zagreb, Hrvatska

Workshop on Risk Communications in Health Crises, WHO, Beograd, Srbija, listopad 2014.

Training course on Contingency Planing and Animal Disease Control DG SANCO, Padova, Italija, studeni 2014.

Training course on Health and Disease Prevention of Bees DG SANCO, Prag, Češka Republika, svibanj 2014.

OIE, Workshop for OIE National Focal Points for Aquatic Animlas (2ND cycle), Lisabon, Portugal, travanj 2013.

Training on Prevention and Control of Emerging Animal Diseases DG SANCO, Antwerp, lipanj 2012.

OIE, Workshop for OIE National Focal Points for Aquatic Animlas, Dubrovnik, Hrvatska, studeni 2011.

Training course on Health of Exotic ZOO Animals DG SANCO, Berlin, studeni 2010.

Training course on Animal health prevention and control of aquaculture animals DG SANCO, Bristol, rujan 2010.

FMD – Real time training course, EUFMD, Erzurum, Turska, lipanj 2010.

Disease outbreak management - Faculty of Life Science, Copenhagen, Danska, travanj 2010.

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA:

FVE, Conference: Caring for health and welfare of fish: A critical success factor for aquaculture”, Brisel, Belgija, svibanj 2013.

CONFERENCE FOR BETTER BEE HEALTH, Brisel, Belija, travanj 2014.

International Aquaculture Biosecurity Conference, Trondheim, Norveška 2009.

POPIS RADOVA:

Radovi u časopisima

Znanstveni i pregledni radovi

Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen; Zupčić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Brnić, Dragan; Acinger Rogić, Žaklin; Sućec, Ivica; Steinhagen, Dieter; Adamek, Mikolaj

Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. // Journal of fish diseases, 43 (2020), 1-13
doi:<https://doi.org/10.1111/jfd.13163> (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Bedeković, Tomislav; Lohman Janković, Ivana; Šimić, Ivana; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Sućec, Ivica; Robardet, Emmanuelle; Cliquet, Florence; Control and elimination of rabies in Croatia. (Nancy OIE/WHO/EU Laboratory for Rabies and Wildlife, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Malzéville, France) // PLoS One, 13 (2018), 9; 1-14
doi:10.1371/journal.pone.0204115 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Vodopija, Radovan; Sokol, Kruno; Lohman Janković, I.; Sućec, Ivica

Oralna vakcinacija lisica protiv bjesnoće u Republici Hrvatskoj - koliko smo uspješni do sada?. // Infektološki glasnik, 36 (2016), 1; 17-2(<https://www.bib.irb.hr/917195>) (domaća recenzija, članak, znanstveni)

Bedeković, Tomislav; Šimić, Ivana; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Mihaljević, Željko;
Sućec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Hostnik, Peter

Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. // BMC Veterinary Research, 12 (2016), 76; 1-7
doi:10.1186/s12917-016-0701-0 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Špičić, Silvio; Benić, Miroslav; Zdelar-Tuk, Maja; Duvnjak, Sanja; Karakaš, Aneta;
Kiš, Tomislav; Sućec, Ivica; Cvetnić, Željko

Brucellosis in Turopolje pig breeding in the 2008-2011 period: an overview of laboratory diagnostics and eradication system. // Veterinarski arhiv., 86 (2016), (2); 243-252 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Stručni radovi

Bedeković, Tomislav; Šimić, Ivana; Lojkić, Ivana; Deždek, Danko; Krešić, Nina;
Sućec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Madić, Josip; Cvetnić, Željko Infekcija virusom sindroma smeđeg zeca. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 45 (2014), 1; 37-40 (podatak o recenziji nije dostupan, članak, stručni)

Drugi radovi u časopisima

Bedeković, Tomislav; Lojkić, Ivana; Lemo, Nina; Jemeršić, Lorena; Keros, Tomislav; Balatinec, Jelena; Brnić, Dragan; Roić, Besi; Jungić, Andreja; Lohman, Ivana et al. Infekcija Schmalleberg virusom - opis slučaja u Republici Hrvatskoj. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 44 (2013), 2; 135-139 (podatak o recenziji nije dostupan, stručna rasprava, stručni)

Radovi u zbornicima skupova

Znanstveni radovi u zbornicima skupova

Pavlak, Marina; Tadić, Marinela; Stevanović, Vlado; Lohman Janković, Ivana; Maltar, Ljupka; Kiš, Tomislav; Sućec, Ivica; Barbić, Ljubo Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of equine viral arteritis. // Proceedings 14th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics / ISVEE Committee (ur.). Merida, 2015. str. 230-230 (poster, međunarodna recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)

Sažeci sa skupova

Sažeci u zbornicima i časopisima

Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana; Mihaljević, Željko; Sućec, Ivica; Veić, Tina; Duvnjak, Sanja Antimicrobial resistance surveillance in Croatian marine farms – preliminary results. // Aquaculture Europe 17. International Conference & Exposition. Dubrovnik, 17-20. Oct. Abstracts / Zrnčić, Snježana ; Mylonas, Constatinos (ur.). Dubrovnik, 2017. str. 849-850 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

Zrnčić, Snježana; Brnić, Dragan; Haenen, Olga; Iburg, Tine; Vendramin, Niccolo; Sućec, Ivica; Oraić, Dražen Epizootiology of Koi herpes virus disease in Croatia. // 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Book of Abstracts / EAFFP (ur.). Belfast, Velika Britanija, 2017. str. 294-294 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Oraić, Dražen; Brnić, Dragan; Sućec, Ivica; Zrnčić, Snježana Koi herpes viroza u šaranskom uzgoju. // 12. Međunarodni gospodarsko znanstveni skup o akvakulturi Vukovar, Hrvatska, 2016. str. 24-25 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, stručni)

Špičić, Silvio; Kiš, Tomislav; Katalinić- Janković, Vera; Račić, Ivana; Richter, Elvira; Žmak, Ljiljana; Zdelar-Tuk, Maja; Reil, Irena; Duvnjak, Sanja; Kompes, Gordan et al. Nontuberculous Mycobacteria presence in wild boars and cattle in Croatia - difficulties with species identification. // Scientific Program including Abstracts / Niemann, Stefan (ur.).

Werne, Njemačka: Agency KONSENSUS Ltd, 2014. str. 91-91 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni) Sućec, Ivica; Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen Aktualno stanje s bolestima riba u uzgoju u RH - prijete iz EU i trećih zemalja. // 10. međunarodni gospodarsko - znanstveni skup o akvakulturi "Hrvatska akvakultura u Europskoj uniji - sadašnjost i budućnost" / Holik, Jugoslav (ur.). Vukovar: Hrvatska gospodarska komora, 2014. str. n/d-n/d (pozvano predavanje, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana; Mihaljević, Željko; Sućec, Ivica Antimikrobna rezistencija u uzgajanim riba – rezultati preliminarnih istraživanja. // 10.

međunarodni gospodarsko - znanstveni skup o akvakulturi "Hrvatska akvakultura u Europskoj uniji - sadašnjost i budućnost / Holik, Jugoslav (ur.). Vukovar: Hrvatska gospodarska komora, 2014. str. n/d-n/d (predavanje, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

Sučec, Ivica; Dražen Oraić; Dragan Brnić; Davor Svoboda; Snježana Zrnčić Prvo izbijanje Virusne hemoragične septikemije u Republici Hrvatskoj. // Zbornik radova Veterinarski dani 2013 / Anđelko Gašpar (ur.). Opatija, Hrvatska, 2013. (predavanje, domaća recenzija, sažetak, stručni)

Druga sudjelovanja na skupovima

Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen; Brnić, Dragan; Sućec, Ivica VHS and IHN outbreaks in Croatia- Diagnosis and management of new outbreaks. // 18th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for Fish Diseases Kopenhagen, Danska, 2014. (predavanje, sažetak, stručni)

Prošireni sažeci u zbornicima i časopisima

Brnić, Dragan; Zrnčić, Snježana; Vendramin, Niccolo; Sućec, Ivica; Oraić, Dražen Molecular epidemiology of Koi Herpes Virus outbreak in Croatia. // Aquaculture Europe 17, International Conference & Exposition Dubrovnik, Hrvatska, 2017. str. 148-149 (predavanje, međunarodna recenzija, prošireni sažetak, znanstveni)