



UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**ISTRAŽIVANJE INFLUENCE  
KOPITARA SA RAZLIČITIM  
EPIZOOTIOLOŠKIM I KLINIČKIM  
NALAZIMA INFEKCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Doc. dr Aleksandar Potkonjak  
Doc. dr Miodrag Radinović

Kandidat: DVM Mihajlo Erdeljan

Novi Sad, 2016. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mihajlo Erdeljan
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Doc. dr sc. Aleksandar Potkonjak, docent Doc. dr sc. Miodrag Radinović, docent
Naslov rada: NR	Istraživanje influence kopitara sa različitim epizootiološkim i kliničkim nalazima infekcije
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	(9 poglavlja / 129 stranica / 28 slika / 3 grafikona / 189 referenci / bez priloga)
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Bolesti životinja
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Kopitari, influenza, HI test, Direktigen, RT-PCR
UDK	619.616.9(043.3)
Čuva se: ČU	U biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Dositeja Obradovića 8, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Influenca kopitara je ozbiljno, akutno, visoko kontagiozno, respiratorno oboljenje kopitara sa karakterističnom kliničkom slikom u tipu respiratornog simptoma. Ovo oboljenje izazivaju dva suptipa influenza A virusa (EIV – ekvini influenza virus) – H7N7 (ranije poznat kao tip 1) i H3N8 (ranije poznat kao tip 2) iz familije <i>Orthomyxoviridae</i> . Cilj istraživanja je bio da se uporede različite dijagnostičke metode za dijagnostiku influenza A virusa kod kopitara sa različitim vakcinalnim statusom i kliničkim nalazom. U eksperimentu je učestvovalo 61 grlo. Sprovedena je epizootiološka anketa, grla su klinički pregledana, analizirana je kompletna krvna slika, urađen HI, Direktigen i RT-PCR test. Rezultati su pokazali prisustvo oba suptipa virusa. Registrovane su seropozitivne jединke kod kojih je dokazano prisustvo antigena virusa influence, ali bez dokazanog prisustva genoma virusa influence.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	11.4.2016.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>_____ Predsednik: Dr sc. Branislava Belić, redovni profesor, Patologija - Patofiziologija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Dr sc. Aleksandar Potkonjak, docent, Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Dr sc. Miodrag Radinović, docent, Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Član: Dr sc. Dragan Rogan, redovni profesor, Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Član: Dr sc. Ramiz Ćutuk, redovni profesor, i Unutrašnje bolesti kopitara, mesojeda i svinja sa propedeutikom i Unutrašnje bolesti preživara kunića sa propedeutikom, Veterinarski fakultet, Sarajevo</p>

University of Novi Sad  
Faculty  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Mihajlo Erdeljan
Mentor: MN	Aleksandar Potkonjak, PhD, assistant professor Miodrag Radinović, PhD, assistant professor
Title: TI	Research of equine influenza with different epizootic and clinical findings of infection
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Dositeja Obradovića 8 Square

Physical description: PD	(9 chapters / 129 pages / 28 images / 3 charts / 189 references / without attachments)
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases
Subject, Key words SKW	Equidae, influenza, HI test, Direktigen, RT-PCR
UC	619.616.9(043.3)
Holding data: HD	In the library of Faculty of Agriculture, Dositeja Obradovića 8, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	Equine influenza is a serious, acute, highly contagious, respiratory disease, equine with characteristic clinical picture in the type of respiratory syndrome. This disease is caused by two subtypes of influenza A virus (EIV - equine influenza virus) - H7N7 (formerly known as type 1) and H3N8 (formerly known as type 2) from the family <i>Orthomyxoviridae</i> . The aim of the research was to compare different diagnostic methods for the diagnosis of influenza A virus in equine vaccine with different status and clinical findings. The experiment involved 61 throat. Conducted epidemiological surveys, clinical throat examined, analyzed the complete blood count, done HI, Directigen and RT-PCR test. The results showed the presence of both subtypes of the virus. Seropositive individuals are registered in which the presence of an influenza virus antigen is confirmed, but without evidence of the presence of the influenza virus genome.

Accepted on Scientific Board on: AS	11.4.2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>_____ President: Branislava Belić, PhD, Full Professor, Pathology - Pathophysiology, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Aleksandar Potkonjak PhD, Assistant Professor, Veterinary microbiology and animal infectious diseases, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Miodrag Radinović, PhD, Assistant Professor, Animal diseases and hygiene of animal products, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Member: Dragan Rogan, PhD, Full Profesor, Veterinary microbiology and animal infectious diseases, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Member: Ramiz Ćutuk, PhD, Full Professor, Internal diseases ungulates, carnivores and swine with propedeutics and Internal diseases of ruminants and rabbits with propedeutics, Veterinary faculty, Sarajevo</p>

## ***LISTA SKRAĆENICA***

AGID – Agar gel imuno difuzija  
AHT – Animal health trust  
AIDS – Acquired immunodeficiency syndrome  
cELISA – Copmetitive enzyme linked immunosorbent assay  
CF – Test fiksacije komplemeta  
COPD – Chronic obstructive pulmonary disease  
EDQM – Evropska direkcija za kvalitet medikamenata  
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid  
EIV – Ekvini influenza virus  
ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay  
GGT – Gama glutamil transferaza  
GLDH – Glutamat dehidrogenaza  
Gran ↑ – Granulocitoza  
HA(H) – Hemaglutinin  
HE – Hematoksilin-eozin  
HI – Inhibicija hemaglutinacije  
IAD - inflammatory airway disease  
IFN-  $\alpha$  – interferon –  $\alpha$   
IL-1 – interleukin-1  
IL-6 – Interleukin 6  
IL-8 – neutrofilprivlačući interleukin-8  
Ly ↓ - Limfopenija  
Ly ↑ – Limfocitoza  
M – Matriks protein  
MCPs – monocit hemoprivlačni proteini  
MDCKC – Madin – Darby Canine Kindey Cells  
MIPs – makrofagni inflamatorni proteini  
mRNK – Mesindžer ribonukleinska kiselina  
NA(N) – Neuraminidaza  
NP – Nukleoprotein



NS – Nestrukturani proteini

OIE – Office International Des Epizooties (Međunarodna organizacija za zaštitu zdravlja životinja)

P – Polimeraza

PCR – Polymerase chain reaction

PA - Polymerase acidic

PB – Polymerase basic

PBS – Phosphate buffered saline

RBC – Red blood cell

RBC↓ – Anemija

RIHA – Reakcija inhibicije hemaglutinacije

RNK – Ribonukleinska kiselina

RT-PCR – Real time polymerase chain reaction

SRH – Singl radijalna hemoliza

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TNF-  $\alpha$  – tumor nekrosis faktor -  $\alpha$

UV – Ultravioletno

VN – virus neutralizujući test

WBC↓ – Leukopenija

WBC↑ – Leukocitoza

WBC↑ & Ne↑ – Leukocitoza sa neutrofilijom

WHO – World health organisation

# **SADRŽAJ**

	<b>Naslov poglavlja</b>	<b>Strana</b>
1.	Uvod	1
2.	Pregled literature	3
2.1.	Etiologija	3
2.1.1.	Mogućnosti interspecijes transmisije influenza A virusa	8
2.1.2.	Otpornost virusa influence na faktore spoljašnje sredine	9
2.1.3.	Evolucija virusa influence kod kopitara	10
2.2.	Istorijat	13
2.3.	Patogeneza	16
2.4.	Klinička slika i patomorfološki nalaz	20
2.4.1.	Klinička slika	20
2.4.2.	Patomorfološki i patofiziološki nalaz	24
2.4.3.	Hronične bolesti koje mogu nastati kao posledica influence	28
2.4.4.	Patogenost virusa influence kod kopitara	30
2.5.	Postupak uzorkovanja krvi i nazalnih briseva	32
2.6.	Dijagnostika	33
2.6.1.	Hematologija	34
2.6.2.	Serološki testovi	35
2.6.3.	Brzi test – Direktigen Flu A test	36
2.6.4.	Lančana reakcija polimeraze - PCR (Polymerase chain reaction)	37
2.6.5.	Izolacija virusa	38
2.7.	Vakcinacija	39
2.7.1.	Uticaj anigenskog drifta na efikasnost vakcinacije	40
3.	Ciljevi i zadaci rada	47
4.	Materijal i metode	48
4.1.	Materijal	48
4.1.1.	Osnovni podaci o geografskoj distribuciji i grupama kopitara uključenih u istraživanje	48
4.1.2.	Uzorkovanje bioloških materijala poreklom od kopitara uključenih u istraživanje	50
4.1.2.1.	Puna venska krv	50
4.1.2.2.	Krvni serumi	50
4.1.2.3.	Brisevi za RT-PCR i Direktigen test	50
4.1.2.4.	Uzorci za patomorfološka, patohistološka i citološka ispitivanja	51
4.2.	Metode	51
4.2.1.	Epizootiološka anketa	51
4.2.2.	Klinički pregled	52

	4.2.3.	Analiza kompletne krvne slike	53
	4.2.4.	Testa inhibicije hemaglutinacije	53
	4.2.5.	BD Directigen EZ Flu A+B, brzi test za diferencijaciju, direktnu detekciju A i B viralnih antigena influence	55
	4.2.6.	Ekstrakcija RNK iz nazalnih briseva i dokazivanje genoma virusa influence primenom RT-PCR testa	56
	4.2.7.	Patomorfološka, patohistološka i citolološka ispitivanja	59
	4.2.8.	Statistička obrada podataka	60
5.		Rezultati	61
	5.1.	Epizootiološki podaci	61
	5.1.1.	Epizootiološki podaci vezani za vakcinisana grla bez kliničkih simptoma	61
	5.1.2.	Epizootiološki podaci vezani za vakcinisana grla sa kliničkim simptomima	62
	5.1.3.	Epizootiološki podaci vezani za nevakcinisana grla bez kliničkim simptoma	63
	5.1.4.	Epizootiološki podaci vezani za nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima	64
	5.2.	Rezultati kliničkog pregleda	66
	5.2.1.	Klinički pregled vakcinisanih grla	66
	5.2.2.	Klinički pregled nevakcinisanih grla	66
	5.3.	Rezultati kompletne krvne slike	67
	5.3.1.	Rezultati kompletne krvne slike kod vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma	67
	5.3.2.	Rezultati kompletne krvne slike kod vakcinisanih grla sa kliničkim simptomima	69
	5.3.3.	Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma	69
	5.3.4.	Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima	72
	5.4.	Test inhibicije hemaglutinacije	74
	5.4.1.	Rezultati HI testa kod vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma	74
	5.4.2.	Rezultati HI testa kod vakcinisanih grla sa kliničkim simptomima	74
	5.4.3.	Rezultati HI testa kod nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma	75
	5.4.4.	Rezultati HI testa kod nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima	75
	5.5.	Rezultati brzog testa - BD Directigen EZ Flu A+B	76
	5.6.	Rezultati dokazivanja prisustva genoma influenza virusa primenom metode RT-PCR	77
	5.7.	Zbirni rezultati	78
	5.7.1.	Zbirni rezultati vakcinisana grla bez kliničkih simptoma	78

5.7.2.	Zbirni rezultati vakcinisana grla sa kliničkim simptomima	80
5.7.3.	Zbirni rezultati nevakcinisana grla bez kliničkih simptoma	82
5.7.4.	Zbirni rezultati nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima	86
5.8.	Rezultati patomorfoloških, patohistoloških i citoloških ispitivanja	89
5.9.	Rezultati statističke analize	94
6.	Diskusija	98
7.	Zaključak	105
8.	Literatura	106
9.	Biografija	128

## **ZAHVALNOST**

*Pre svega ovim putem bih želeo da se zahvalim mojim mentorima doc. dr Aleksandru Potkonjaku i doc. dr Miodragu Radinoviću na neizmernoj pomoći u izradi ove doktorske disertacije. Takođe se zahvaljujem i članovima komisije prof. dr Branislavi Belić, prof. dr Ramizu Čutuku i prof. dr Draganu Roganu na korisnim sugestijama koje su mi uputili.*

*Ne želeći nikoga da neopravdano izostavim želeo bih da se zahvalim osoblju Departmana za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“, koji su pomogli u obradi i analizi uzoraka. Zatim osoblju Veterinarske klinike Kać, Specijalnog rezervata Zasavica i Konjičkog kluba „Sajam“, kolegama sa terena, vlasnicima konja i magaraca koji su pomogli u obezbeđivanju oglednih životinja. Kao i svima drugima koji su mi pomogli a ovom prilikom nisu pomenuti.*

*Autor*

## 1. UVOD

Influenca je kod kopitara zabeležena u literaturi verovatno još u Antičkoj Grčkoj. Pouzdani zapisi potiču iz 1874. godine (Thiemann i Bell, 2001.). To je ozbiljno, akutno, visoko kontagiozno, respiratorno oboljenje kopitara sa karakterističnom kliničkom slikom (Bountouri i sar., 2011.). Ovo oboljenje izazivaju dva suptipa influenza A virusa (EIV – ekvini influenza virus) – H7N7 (ranije poznat kao tip 1) i H3N8 (ranije poznat kao tip 2) iz familije *Orthomyxoviridae*, sa naznakom da H7N7 virus nije izolovan kod kopitara već duže vreme (Ataseven i Daly, 2007.).

Ime *influenca* potiče od stare latinske reči, koja označava bolesti koje se pojavljuju iznenada kod ljudi a koje su se interpretirale kao rezultat astroloških uticaja zvezda i mističnih sila sudbine.

Klinički znaci bolesti su slični kako kod magaraca tako i kod konja a to su: pireksija, dispnoa, kašalj, iscedak iz nosa, anoreksija, depresija i inapetencija.

Influenca A virus je visoko infektivni respiratorni patogen za kopitare (Hannant i Mumford 1996., Palese i Shaw 2007.) i najčešće se brzo širi u zapatima imuno nekompetentnih kopitara. Ekvini influenza A virus se smatra najvažnijim izazivačem respiratornih oboljenja kod konja, magaraca i mula (Laabassi i sar., 2014.). Morbiditet iznosi 10-100% a mortalitet 0,5- 10% (Trailović, 2000.). Međutim, u velikom broju eksperimentalnih ispitivanja kao i u prirodnim epidemijama (Abdalla i sar., 1993.; Chenchev i sar., 1992.; Holland i sar., 1999.; Rose i sar., 1970.) pokazalo se da je smrtnost veća a klinički znaci izraženiji kod magarca u odnosu na konje. Utvrđeno je takođe, da zaraženi magarci imaju veće sklonosti ka razvijanju sekundarnih bakterijskih bronhopneumonija. Stoga je neophodna upotreba antibiotske i antiinflamatorne terapije kod magaraca (Thiemann i sar., 2012.). Drugi autori pak navode postojanje udružene infekcije sa plućnim vlašcima (Rose i sar., 1970.). Zbog većeg morbiditeta i mortaliteta uputno je primenjivati efikasnu vakcinaciju protiv influence, a prilikom lečenja koristi i tretman protiv plućnih vlašaka uz terapiju antibioticima u cilju suzbijanja sekundarne bakterijske bronhopneumonije (Caerdwell i sar., 2000.). Ovo oboljenje je veoma kontagiozno i prenosi

se najčešće u direktnom kontaktu. Kod konja obično prolazi bez značajnih posledica ali može dovesti do gubitka radne sposobnosti pa čak i do uginuća.

Izbijanje influence kopitara zabeleženo je u celom svetu osim na malom broju ostrva i na Novom Zelandu i Islandu (Culliname i Newton, 2013). Istraživanje u susednoj Bugarskoj obuhvatilo je ispitivanje antitela u serumima primenom inhibicije hemaglutinacije gde je od ukupno 192 uzorka pozitivnih bilo 126 (65.6%) (Chenchev i sar., 2011). U našoj zemlji zabeleženo je 2004-te godine oboljevanje velikog broja konja (380) sa skoro 100% seroprevalencom (Šekler i sar., 2009.). Od influence su dva uginula konja a veliki broj konja je povučen iz treninga (Čilerdžić i sar., 2005). Jedno od zadnjih istraživanja na magarcima otkrilo je prisustvo specifičnih antitela kod 26.5% životinja i to protiv suptipova H5N1 i H7N2 (Vasković i sar., 2011.).

Treba istaći da su obimna istraživanja vršena u svetu na seroprevalenci ekvine influence kod kopitara. Poslednjih godina druge vrste kopitara, kao što su magarci mule i poni konji, su ispitivani. Tako je zabeleženo da je prevalenca influence kod kopitara u Pakitanu oko 12% (Sadij i sar., 2012.), dok je u Turskoj oko 9.4% (Ataseven i Daly, 2007.).

U rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici najčešće se koristi serološki test inhibicije hemaglutinacije. Sada postoje komercijalni brzi testovi, kao što je Directigen FLU-A test, koji se, iako je osmišljen za dijagnostiku humane influence, može koristiti za detekciju influence kopitara (Chambers i sar., 1994.). Uzorak se uzima brisom iz nosa ili dubljih partija respiratornog trakta i zahteva samo 15 minuta za dobijanje rezultata. Detekcija virusa se može sprovesti izolacijom virusa iz nazo-labijanog brisa preko kokošijih jaja ili kulture ćelija, odnosno serološki preko testa inhibicije hemaglutinacije i to u parnim serumima (OIE, Terrestrial Manual, 2015.). U poslednje vreme se preporučuje PCR metoda kao brža i specifičnija metoda u odnosu na virusnu izolaciju (Quinlivan i sar., 2004.; Savić i sar., 2015.).

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Etiologija**

Virus influence tipa A, za razliku od tipa B i C, je uzročnik influence kod velikog broja različitih domaćina kako sisara tako i ptica - ljudi, živine, svinja, konja, pasa, mačaka, tigrova ali i drugih sisara kao što su kune, foka i kitovi (Swayne i King 2003.; Starick i sar., 2008.; OIE, 2011.; Siengsan-Lamont i sar., 2011.; Mancini i sar., 2012.; Moriguchi i sar., 2013.).

Virus influence pripada porodici *Orthomyxoviridae*. Ortomiksovirusi predstavljaju sferična telašca, prečnika 80 do 120 nm, u čijem centru se nalazi jezgro sa jednolančanom RNK i segmentiranim genomom. On se sastoji od 8 gena (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M2 i NS) i svi su sposobni za replikaciju, a pored toga kontrolišu stvaranje dva nestrukturna proteina (NS1 i NS2). Ovih 8 gena šifruje 10 virusnih proteina. Tri proteina su najvažnija a to su hemaglutinin (HA), neuraminidaza (NA) i matriks 2 protein (M) jer čine sastavni deo virusnog omotača i imaju veoma važnu ulogu u stimulisanju imunog odgovora domaćina. Šematski prikaz virusa iz porodice *Orthomyxoviridae* je prikazan na slici 1.





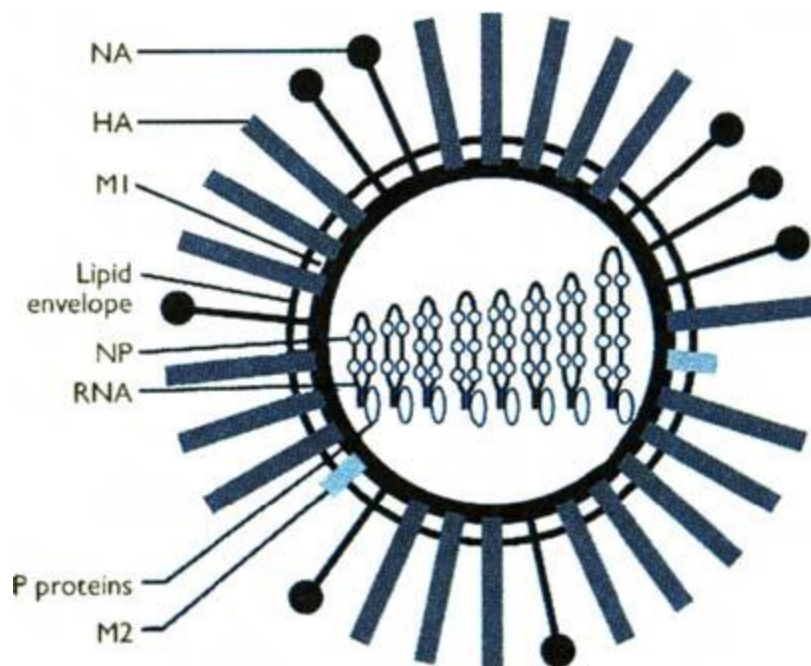
***Slika 1. Šematski prikaz izgleda virusa iz familije Ortomyxoviridae, (Palić i Resanović, 2005.).***

Unutrašnji proteini (matriks, ribonukleoproteinski kompleks i polimeraze) su nosioci specifičnosti vrste virusa, tj. daju odgovor na pitanje da li se radi o tipu A, B ili C virusa influence. Influenca A virus izaziva oboljenje ljudi, ptica, svinja, morskih sisara, kuna i drugih životinja. Influenca B virus izaziva isključivo oboljenje ljudi, dok influenza tipa C izaziva oboljenje ljudi i svinja, ali u vrlo benignom obliku. Ovi unutrašnji antigeni su stalni i stabilni.

Influenca A virus se sastoji od dva glavna glikoproteina a to su Hemaglutinin (HA) i Neuraminidaza (NA) (Ito i sar., 2001.). Influenca A virus je podjeljen na više suptipova na bazi hemaglutininskih antigena i na bazi antigena neuraminidaze. Do sada je otkriveno 18 različitih HA suptipova (H1 do H18) i 11 različitih NA suptipova (N1 do N11) (Tong i sar., 2013.).

Serološko određivanje suptipa hemaglutinina se vrši pomoću testa inhibicije hemaglutinacije (HI), a za određivanje suptipa neuraminidaze koristi se test inhibicije neuraminidaze (NI) i AGP test. Od 1980, procesi determinacije tipova i suptipova su standardizovani za sve tipove i suptipove virusa influence ptica, svinja, konja i ljudi, kao i njihove nomenklature. Ova ekstremna antigenska varijabilnost uslovljava pojavu 256 različitih podtipova virusa koji se teoretski mogu pojaviti i izazvati influencu. Svi poznati suptipovi (H1 do H18 i N1 do N11) su izolovani kod vodenih ptica, osim H17N10 i H18N11 koji su izolovani kod slepih miševa (Tong i sar., 2012; 2013.). Vodene ptice, galebovi i ptice

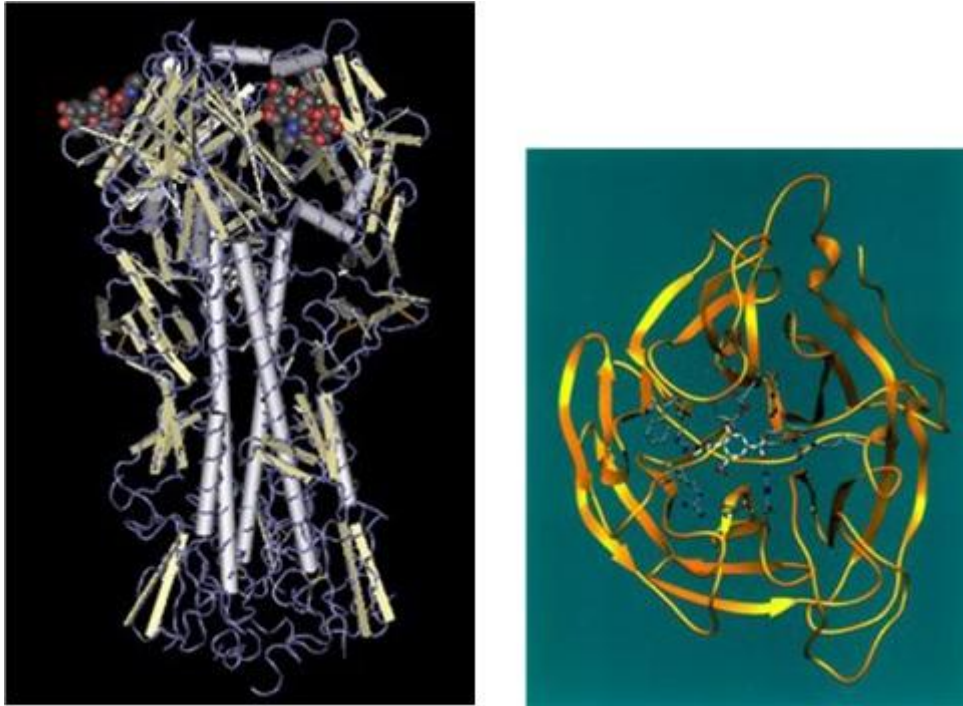
koje žive na obalama se smatraju prirodnim domaćinima i rezervoarima za viruse influence A (Kawaoka i sar., 1988.; Slemons i sar., 1974.).



***Slika 2. Šematski prikaz influenza A viriona – prikaz tri različita tipa usidrenih transmembranskih proteina: hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA) koji formiraju karakteristične peplomere i M2 proteina, koji je kratak i ne vidi se pod elektronskim mikroskopom. Unutar viriona postoji sloj M1 proteina koji okružuje osam ribonukleoproteina (RNP) struktura, svaki od njih se sastoji od jednog RNK segmenta pokrivenog nukleoproteinom (NP) koji je povezan sa tri polimeraza (P) proteina. RNK segment postoji u circularnoj konformaciji stabilizovanoj baznim parovima između njihovih 3' i 5' krajeva. (Palese i Garcia-Sastre, 1998.).***

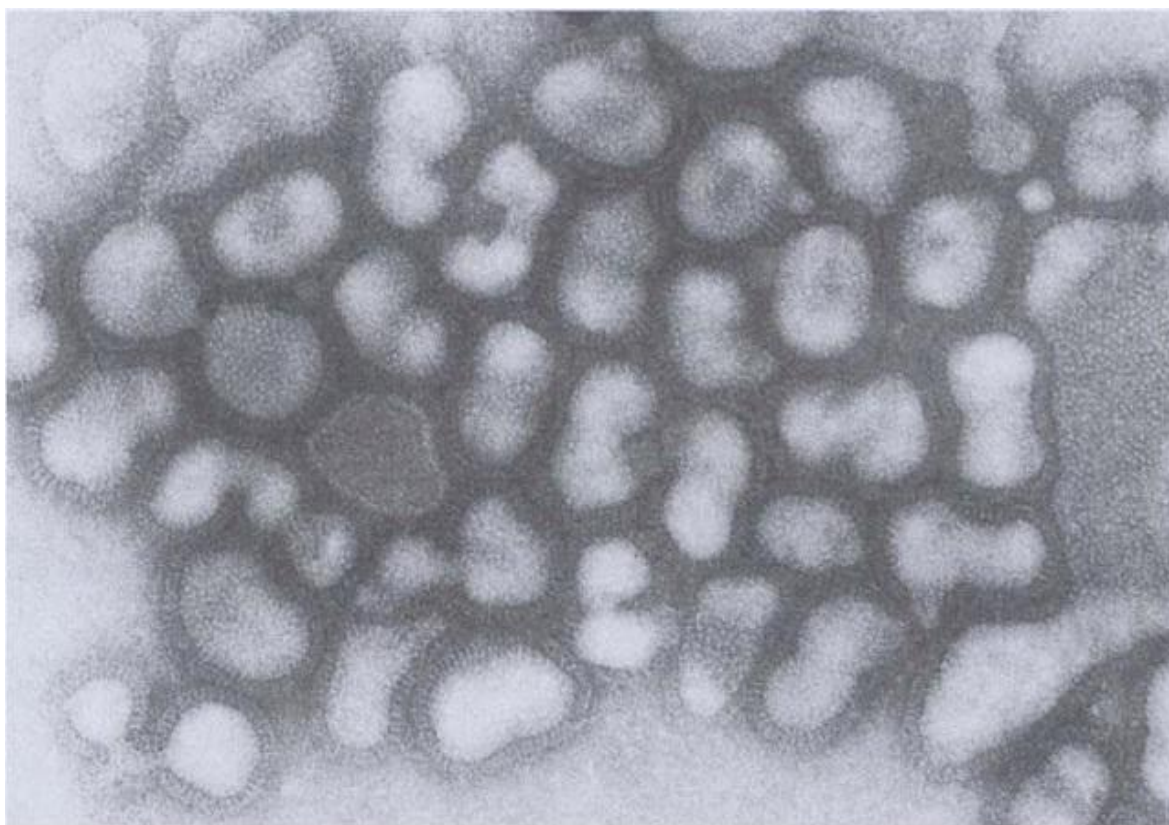
Spoljni glikoproteini (HA i NA) određuju suptip virusa. Visoka varijabilnost virusa influence A potiče od čestih promena spoljašnjih glikoproteina. Hemaglutinin (HA), kao najveći spoljašnji glikoprotein (molekulske mase 80000 daltona) igra važnu ulogu u nastajanju infekcije. Cepanjem na HA1 (molekulske mase 50 000 daltona) i HA2 (molekulske mase 30 000 daltona) uz pomoć enzima ćelije domaćina, aktivira se infektivni i patogeni karakter virusa. Hemaglutinin u nastajanju infekcije ima dve ključne uloge: da

pripoji virus za receptore ćelije domaćina i da izvrši fuziju lipidnog virusnog omotača sa ćelijskom membranom, te na taj način uvodi celokupni genom virusa u intracelularni prostor.



*Slika 3. Simplifikovani model molekula hemaglutinina i neuraminidaze, (Palić i Resanović, 2005.)*

Neuraminidaza (NA) je glikoproteinski enzim koji učestvuje u prodiranju virusa u ćelije domaćina i pomaže pri izlaženju replikovanih ćelija virusa, sprečava njihovu agregaciju i potpomaže širenje virusa po organizmu domaćina.



***Slika 4. Familija Orthomyxoviridae, rod Influenzavirus A, influenza virus A/Hong Kong/1/68 (H3N2). Virioni pokazuju izražene peplomere, koje su u stvari sastoje od dve vrste: hemaglutinina i neuraminidaza. Elektronska mikroskopija, uveličanje 70.000x. (Murphy i sar., 1999.)***

Virus influence je prvi put izolovan kod konja u Čehoslovačkoj 1956 (Sovinova i sar., 1958.). To je bio suptip H7N7. To je bio soj koji je označen kao virus influence A/eq/Prague/56 (Daly i Mumford, 2001.). Virus H7N7 je potom otkriven u nekoliko evropskih zemalja i u Severnoj Americi. H7N7 suptip je još uvek zastupljen u vakcinama koje se koriste u većini zemalja, iako istraživanja ukazuju da je taj suptip zadržan samo na veoma niskom nivou u nekim delovima sveta, a postoji mogućnost i da je potpuno nestao (Madić i sar., 1996.). Međutim, H7N7 je serološki dokazan i kod vakcinisanih i nevakcinisanih konja u Turskoj (Ataseven i Daly, 2007.), Izraelu (Aharonson-Raz i sar., 2014.), Brazilu (Heinemann i sar., 2009.; Mancini i sar., 2014.) i Nigeriji (Olusa i sar., 2010.).

Influenca A virusi suptip H3 a naročito H3N8 virusi su visoko adaptivni jer su nađeni kod velikog broja vrsta ptica i sisara (Solorzano i sar., 2015.). Serološki je dokazano prisustvo virusa i kod ljudi koji su u bliskom kontaktu sa konjima (Larson i sar., 2015.). U skorije vreme zabeleženo je prenošenje influenza A virusa suptip H3N8 sa konja na pse (Feng i sar., 2015.) kao i eksperimentalna infekcija svinja (Solorzano i sar., 2015.).

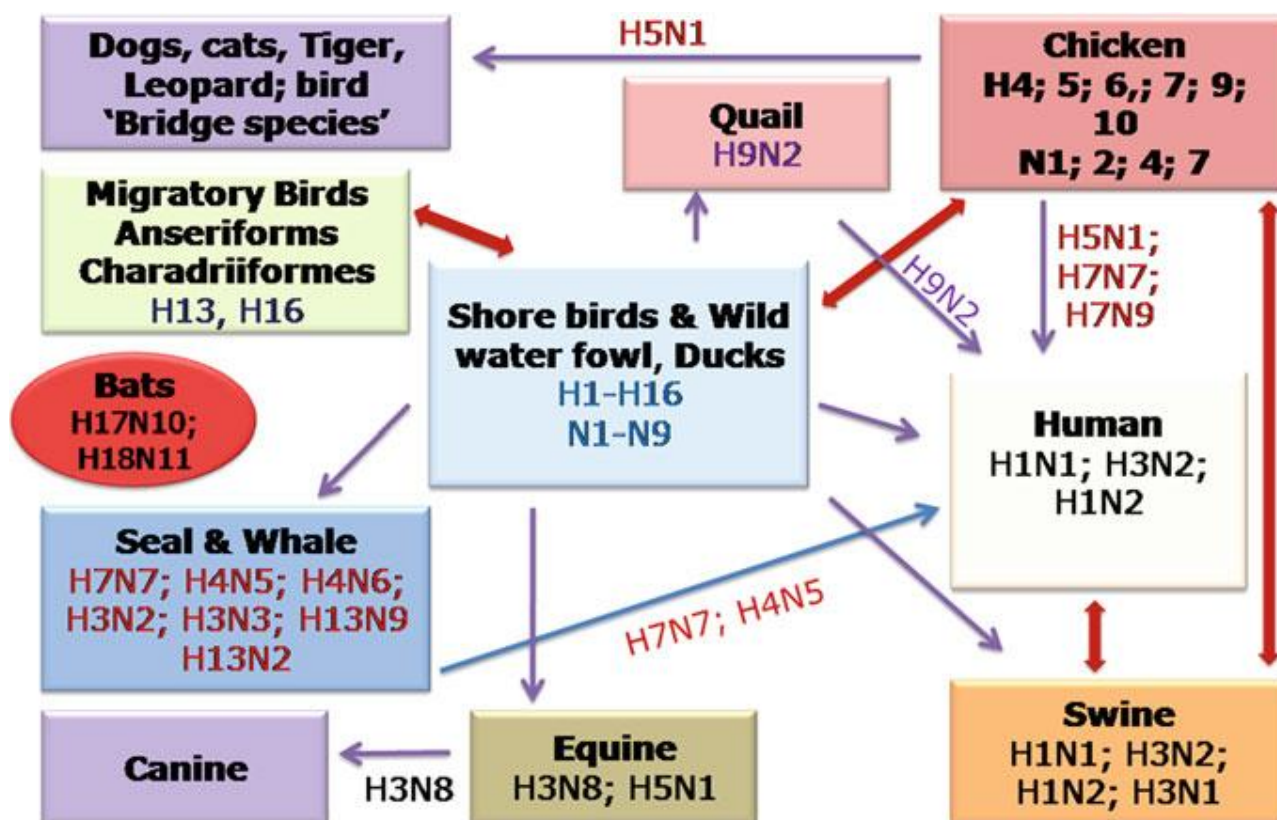
Antigene varijacije mogu dovesti do velikih epidemija influence, kao što se dogodilo u periodu od 1979. do 1981. u Evropi i Severnoj Americi.

Nedavni epidemija u Dubaiju, Filipinima i Portoriku izazvane su uvozom zaraženih konja iz Amerike, što dodatno naglašava lakoću sa kojom se konjska influenza može uvesti u osetljive populacije kao rezultat međunarodnog kretanja konja. Takođe po prvi put je 2007. godine zabeležena epidemija influence kod konja u Australiji kao posledice neuspelog karantiranja jednog ili više zaraženog grla (Webster, 2011.).

Zbog toga međunarodna organizacija za zaštitu zdravlja životinja (OIE) preporučuje da zemlje uvoznice, koje su prethodno bile bez influence treba da zahtevaju da svi kopitari koji putuju iz enzooske oblasti budu vakcinisani i da su dobili svoju poslednju buster dozu u periodu od 2 do 8 nedelja pre putovanja.

### ***2.1.1. Mogućnosti interspecijes transmisije influenza A virusa***

Korišćenjem savremenih metoda dijagnostike potvrđene su infekcije virusom influence kod pripadnika dve ili više vrsta a koje su obično bile u bliskom kontaktu. Tako se smatra da je virus koji je izazvao infekciju kod konja u Kini (A/eq/Jilin/89) potekao od vodenih ptica (Guo i sar., 1992.). Takođe je dokazana infekcija pasa sa konjskim virusom H3N8 tokom epidemije u Australiji 2007. godine ali bez daljeg prenosa među psima (Kirkland i sar., 2010.). U skorije vreme takođe je zabeleženo prenošenje influenza A virusa suptip H3N8 sa konja na pse (Feng i sar., 2015.). Zatim kod velikog broja prirodno inficiranih ljudi (1400) gde su 648 slučajeva povezano sa pticama (H5N1), 396 sa svinjama a 375 sa drugim suptipovima (Freidl i sar., 2014.). Postoje i drugi slučajevi gde su infekcije ljudi povezane sa konjima (Minuse i sar., 1965.; Alford i sar., 1967.; Larson i sar., 2015.). Ovi podaci govore o zoonotskom i interspecijes potencijalu virusa influence. Neke od mogućih interspecijes transmisija su prikazane na slici 5.



Slika 5. Mogućnosti interspecies transmisije influenza A virusa (Kapoor i Dhama, 2014.).

### 2.1.2. Otpornost virusa influence na faktore spoljašnje sredine

Influenca A virus je različito osetljiv na uslove spoljašnje sredine. Rezistencija zavisi od supstrata u kome se nalazi kao i od nekih drugih faktora spoljašnje sredine. Preživljavanje virusa influence u kapljicama, koji se izbacuju kijanjem, zavisi od relativne vlažnosti i direktne sunčeve svetlosti (Kapoor i Dhama, 2014.). Stoga, niska vlažnost i slaba sunčeva svetlost pomažu u preživljavanju virusa u iskijanim kapljicama i na taj način pomažu u transmisiji (Weber i Stilianakis, 2008.).

Virus influence može da preživi od nekoliko nedelja do 105 dana na temperaturi od 4° C. Na temperaturi od 25° C može da preživi više od 10 dana. U nehlorisanoj vodi na temperaturi od 0° C preživi i do 30 dana, a na temperaturi od 22° C preživi 4 dana. U veoma

suvom fecesu preživi svega dva dana. U zamrznutom materijalu može da ostane infektivan neodređeno dug period.

Temperatura od 56° C uništava virus za 3 časa, a temperature više od 60° C za manje od 30 minuta.

Virusi influence su osetljivi na veći broj deterdženata i dezinfekcionih sredstava. Različiti deterdženti se koriste za uništavanje virusa influence, kao što su: anjonski, katjonski, neutralni i sredstva koja rastvaraju masti razaraju virusni omotač i znatno umanjuju njegovu infektivnost. Fizička sredstava kao što su UV i gama zraci inaktivišu virus, ali struktura antigena ostaje ista.

U cilju dezinfekcije objekata i opreme koriste se sledeći rastvori: 2% natrijum hipohlorit, 4% kvaternerne amonijumove soli, 3% kalcijum hidroksid, 2% kreozolična kiselina i 2% sintetski fenol (za podove) i formalin za završnu dezinfekciju (fumigaciju) celog objekta.

### ***2.1.3. Evolucija virusa influence kod kopitara***

Animal Health Trust (AHT) je referentna laboratorija za influencu kopitara i pripada Međunarodnoj organizaciji za zaštitu zdravlja životinja (OIE) i poseduje obimnu arhivu sojeva koji se dostavljaju iz celog sveta. Koristeći ove podatke, antigenska mapa je napravljena korišćenjem tehnike koja je nazvana "antigenska kartografija" (slika 6). Ova tehnika omogućava slikovno predstavljanje HI podaka iz testova koji se rutinski generišu kao deo procene "tipiziranja" svake nove influence kod konja.





Filogenetska analiza HA sekvenci pokazala je da konjski H3N8 virus, koji se razvijao kao jedna loza tokom najmanje dve decenije (Kawaoka i sar., 1989.), divergirao u dve različite linije tokom sredine 1980-ih (Daly i sar., 1996.). Virus iz jedne linije su uglavnom izolovani kod konja na kontinentalnom delu Amerike, dok su virusi iz druge linije bili gotovo isključivo izolovani kod konja u Evropi i Aziji. Najnovije filogenetsko stablo konjskih H3N8 sojeva je složenije (slika 6).

Evroazijske linije sojeva (prikazano u zelenoj boji na slici 6), koje predstavlja Newmarket/2/93, nastavljaju da formiraju jedinstvenu granu, ali su retko izolovani u poslednjih nekoliko godina (Bryant i sar., 2009.). Američke linije sojeva trenutno dominiraju, ali su se razvile u tri različita grane. Originalne američke linije sojeva, predstavljene sa Newmarket/1/93 i Kentucky/1994 (crveno na slici 6), nisu u potpunosti zamenjene sa izolatima sojeva ove grane u Velikoj Britaniji (Bryant i sar., 2009.) i Čileu (Muller i sar., 2009.) tokom 2006. godine.

U okviru američke linije postoji i pod-linija poznata kao Florida linija (plavo i ljubičasto na slici 6). Sojevi koji su izazvali širenje oboljenja u Njumarkeu 2003. godine i koji su se proširili širom Evrope ubrzo nakon toga, pripadali su ovoj Florida pod-liniji, kao i većina sojeva izolovanih u Evropi od 2003. godine (Damiani i sar., 2008.; Bryant i sar., 2009.; Rozek et al, 2009.). Međutim, sada se mogu razlikovati dve grane u ovoj pod-liniji; Florida grana 1 virusi - izolovani u Severnoj Americi od 2003. godine (npr. Ohio/2003) i razlikuju se od Floride grana 2 sojeva koji su proširili na Evropu (npr. Newmarket/5/03) (Daly i sar., 2011.). Florida grana 1 virusi su prouzrokovali epidemiju u Južnoj Africi krajem 2003. godine, a kasnije i u Japanu i Australiji 2007. godine (Bryant i sar., 2009.).

Florida grana 2 virusi su bili odgovorni za velike epidemije u Kini, Mongoliji i Indiji od 2007. do 2009. godine (Qi i sar., 2010; Virmani i sar., 2010.). U filogenetske analize ukazuju na sporadični upade virusa iz Severne Amerike u Evropu i druge regione, kao što se to dogodilo oko 1993. i 2003. godine, što je praćeno periodom više lokalizovane divergentne evolucije (Daly i sar., 2011.).

Mogućnost da se napravi razlika između dve grupe proizilazi iz podataka dobijenih iz genetskih sekvenciranja i antigenskih HI testova koji se rade protiv serije od 34 antiseruma dobijenih od različitih H3N8 sojeva influence kopitara. Ova analiza pomaže u otkrivanju gde je konkretni soj nastao i može se koristiti za direktno poređenje različitih izolata sa onima koji su već sadržani u bazi podataka sojeva virusa influence kopitara koji su prikupljeni od prve pojave H3N8 kod konja 1963 godine (Newton, 2008).

## 2.2. Istorijat

Pretnja animalne influence nije nova (Morens i Taubenberger, 2010), postoje hiljade mogućih epidemija tokom vekova, pa čak i milenijuma koje su prijavljene, ali nikad nisu sistematski ispitane. Pouzdani organizovani istorijski podaci praktično ne postoje jer pre "mikrobiološke ere" pogled na ovakvo i slična obolenja je bio dosta ne-naučni.

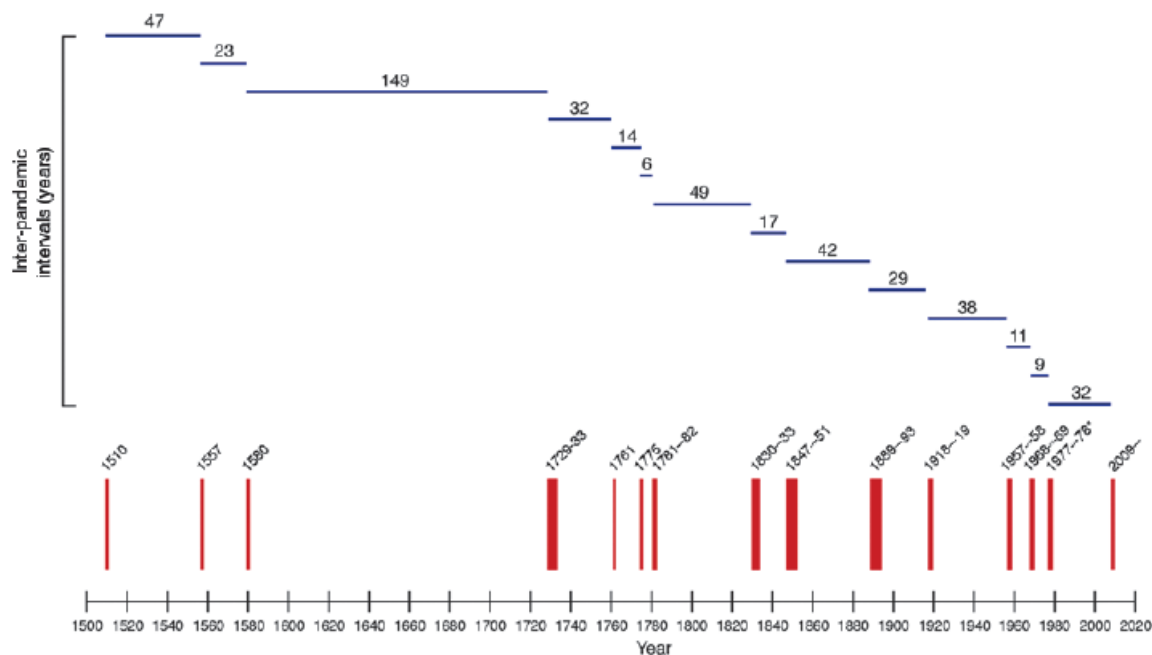
Glavni problem sa pregledom istorijske literature u potrazi za dokazima influence kod životinja je to da što se ide dalje nazad u prošlost, postaje sve teže da se identifikuje influenza. Pre 16. veka, epidemije svih vrsta su evidentirali obično pravnici bez lekarskog znanja, a samim tim i bez procene etiologije, patogeneze, karakterističnih/patognomoničnih znaka, ili bilo kog savremenog metoda na osnovu kojeg se danas postavlja dijagnoza, identifikaciju i klasifikuju specifičnih bolesti.

Humana influenza se ipak može povremeno prepoznati istorijski, kada postoje dokazi, kao što su nepogrešive kliničke i epidemiološke karakteristike obolenja, kao što je eksplozivni epidemijaskih febrilni kašalj koji ubija imunokompromitovane. Potraga za istorijskim dokazima animalne influence dosta je komplikovanija.

Klasične književnosti Grčke, Rima, i drugih antičkih civilizacija, kao i navodi iz Srednjeg veka, prepuni su izveštaja o epidemijama bolesti životinja. U većini slučajeva, bolest koja je u pitanju je toliko nejasno opisana da je identifikacija moderne bolesti teška ili nemoguća.

Do kraja 18. veka praktično nije bilo veterinara ili veterinarske škole. Izveštaji o bolestima kod životinja uglavnom se javljaju kao anegdote i dolaze od lekara, poljoprivrednika, ili zainteresovanih građana. Bolesti za koje sada znamo da imaju različitu etiologiju često su bile pomešane. Do početka 20. veka mnoge bolesti su podvođene pod isto ime, a danas su poznate kao različite i to obično na osnovu njihove različite etiologije. Tako se dešavalo da umesto pojedinačnih bolesti čije se manifestacije razlikuju pod uticajem različitih loše definisanih uslova životne sredine, ili zemljišno / atmosfersko / klimatskih uticaja imamo samo jedan vrlo opšti naziv grupe sličnih oboljenja. Kvalitet ovakvih zapisa o bolestima životinja ostaje oskudan sve do kraja 19. veka. Referentni radovi na temu istorijske pojave humane i animalne influence regularno se pojavljuju još od 1532. godine ali oni često zavise od primarnog izvora informacija, obično su subjektivne i ne-naučne prirode a uglavnom potiču od spekulacija, rasprava, izjava svedoka, dnevnika i sujeverja.

Pojava epidemija je često bila vezana za ratove i velike migracije stanovništva, što je i logično kako sa epidemiološkog stanovišta tako i sa stanovišta da se u takvim situacijama više toga i beležilo u raznim hronikama. Upoređivanjem ovakvih materijala može se sastaviti jedan histogram najvažnijih pojava pandemija influence od početka 16. veka pa na ovamo, kakav je prikazan na slici 7.



**Slika 7. Pandemije influence od 1510. godine (Morens i sar. 2009.)**

Da li je veliki broj izveštaja o bolestima sličnim influenci kod konja, koji su se pojavljivali tokom vekova, zaista influenza? Ono što se može uzeti kao stvarno jasan dokaz influence kopitara predstavlja prisustvo kliničkih znakova, vremensko-geografska povezanost sa humanom influencom, visoka eksplozivnost i brz prenos sa konja na konja u pretrpanim štalama - i period inkubacije kako za konjske tako i za humane slučajeve. Tek na prelazu između osamnaestog i devetnaestog veka počelo se verovati da su te dve bolesti (kod konja i ljudi) ustvari jedna koja se prenosi u oba smera. Takođe treba uzeti u obzir i lošu diferencijalnu dijagnostiku drugih klinički konzistentnih respiratornih oboljenja visoke kontagioznosti.

U vreme kada su konji bili sve prisutni u praktično svim ruralnim i urbanim dešavanjama, sasvim je jasno da su imali veliku ulogu u održavanju cirkulacije virusa influence i u njegovoj evoluciji analogno onoj ulozi koje svinja imaju u modernom dobu.

Virus H3N8 otkriven je kod konja početkom šezdesetih godina dvadesetog veka (Waddell i sar., 1963.). Virus koji je izolovan u Majamiju 1963. godine sada nosi oznaku A/eq/Miami/63. Ovo je aktuelni suptip koji je nastavio da izaziva oboljenje kod životinja u Evropi i Severnoj Americi praktično do danas i kao i dalje cirkulišući virus koji enzotski prouzrokuje bolesti predstavlja značajan ekonomski problem (Paillot i 2006.).

Sa H3N8 virusom mogu se inficirati ljudi eksperimentalno (Alford i sar., 1967.), a primećeno je da je nekoliko grupa ljudi koji su rođeni krajem 19. veka, naročito oni rođeni oko 1893. godine, pokazavalo serološku reaktivnost na H3N8 virus i mnogo decenija kasnije (Minuse i sar., 1965.).

Reprezentativni sojeva iz ovih epidemija su kasnije inkorporirani u vakcine i godišnja vakcinacija trkačkih i takmičarskih konja postala je obavezna u nekoliko evropskih zemalja. Sprovedenjem obavezne vakcinacije od 1981., influenza nije dijagnostikovana kod konja u Irskoj i Velikoj Britaniji skoro celu deceniju. Godine 1989., velika epidemija influence izbila je u Evropi. Antigenska i genetička analiza virusa izolovanog u Velikoj Britaniji (A/eq/Suffolk/89) pokazala je da se znatno razlikovao od soja (A/eq/Fontainebleau/79) iz prethodne evropske epidemije (Binns i sar., 1993.)

Novi soj virusa influence izazvao je epidemiju u severo-istočnoj Kini 1989., sa ukupnom stopom morbiditeta od 80% i mortaliteta od 20%. Soj virusa iz ove epidemije (A/eq/Jilin/89) je sličniji sa virusom influence koji je kružio među vodenim ptica nego sa savremenim konjskim virusom influence, što pokazuje da je epidemija bila rezultat pojave virusa ptičijeg gripa iz rezervoara (Guo i sar, 1992.). Serološka ispitivanja su dokazala da je ovaj virus nastavio da cirkuliše među konjima tokom 5 narednih godina (Guo i sar, 1995.), ali nije bilo izveštaja o smrtnim slučajevima usled infekcije ovim virusom od inicijalnog izbijanja 1989.

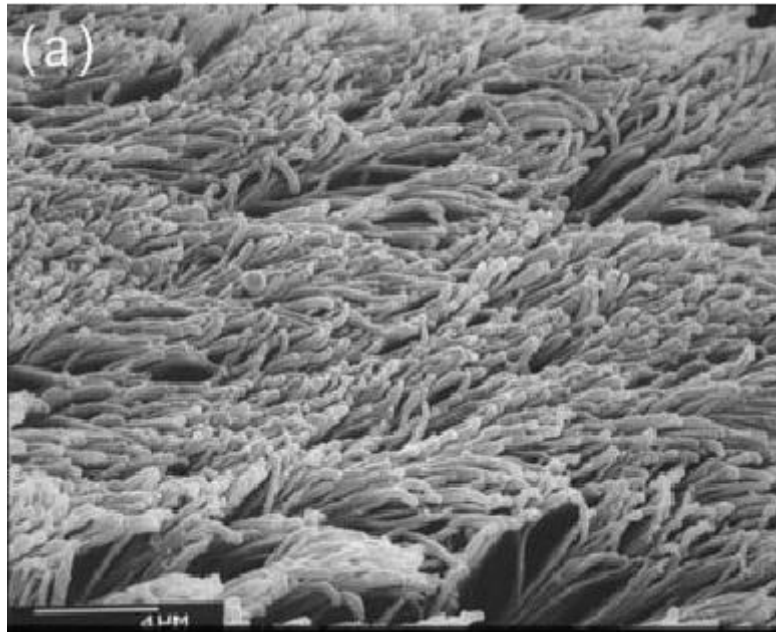
Neki od najrazornijih epidemija influence kopitara desile su se kada je virus uveden u oblasti prethodno bez bolesti. U Južnoj Africi 1986. godine, trke su otkazane tokom više od 2 meseca, zbog epidemije influence. Godinu dana kasnije u toku epidemije influence u Indiji, bilo je inficirano preko 27.000 kopitara a nekoliko stotina životinja je uginulo. Godine 1992.,

epidemija influence kopitara zahvatila je većinu konja u Hong Kongu, uprkos vakcinaciji, i na taj način teško poremetila trkački sport sa velikim materijalnim gubicima (Powell, 1995.). Postoje dokazi koji ukazuju da su ove epidemije rezultat uvoza zaraženih konja iz Evrope (Kawaoka i Webster, 1989.; Gupta i sar., 1993.; Lai 1994.).

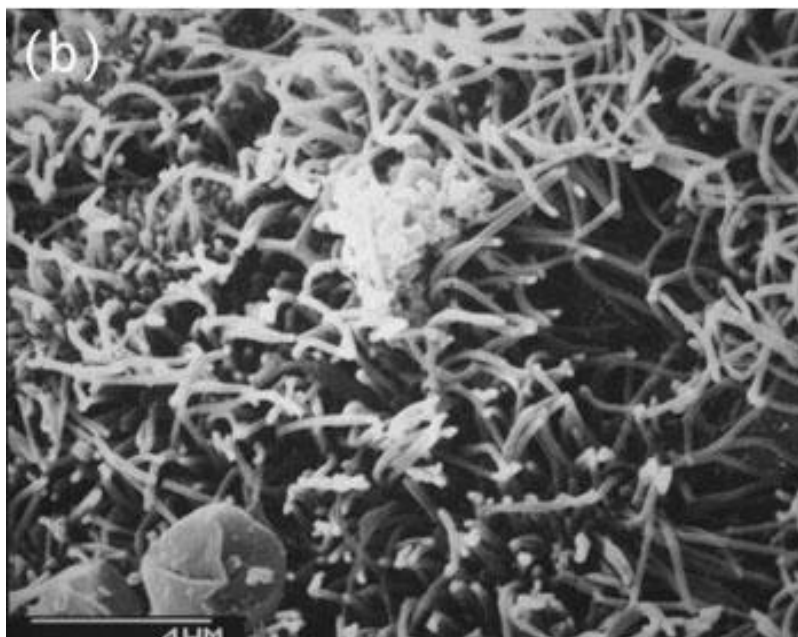
### ***2.3. Patogeneza***

Infekcija influence se uglavnom širi respiratorno, odnosno inhalacijom virusnih partikula. Načini transmisije virusa influence uključuju direktni kontakt između zaražene i osetljive jedinke, zatim aerogeno preko aerosola proizvedenog od strane zaražene jedinke ili indirektno preko kontaminiranih površina (Hall, 2007.; Weber i Stilianakis, 2008.). Jasna demarkacija između različitih puteva transmisije često nije izvodljiva, a sva tri načina transmisije mogu rezultirati širenjem virusa (Tellier, 2006.). Samo jedno kihanje rezultira izbacivanjem oko 40,000 kapljica (Cole i Cook, 1998.) a inhalacija samo jedne kapljice može da izazova bolest (Weber i Stilianakis, 2008.).

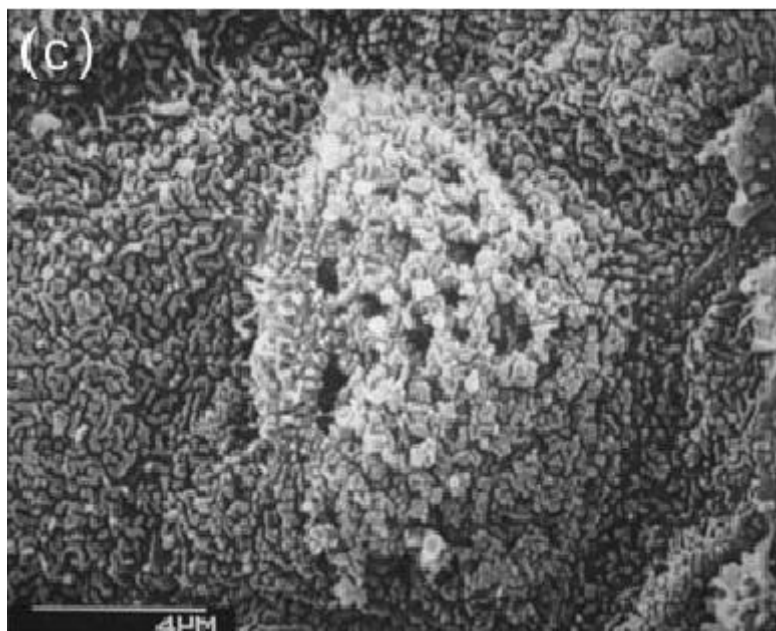
Posle ekspozicije virusu, dolazi do slepljivanja virusa sa epitelijalnom površinom a zatim i do replikacije u ćelijama. Virioni se oslobađaju i putem ove metode replikacije virusu je potrebno da se raširi kroz respiratorni trakt 1 do 3 dana (Kobluk i sar., 1995). Mada drugi autori navode da virus inficira epitelne ćelije prekrivene cilijama u gornjim i donjim disajnim putevima i može izazvati decilijaciju velikih područja respiratornog trakta u roku od 4 do 6 dana (Daly i Mumford, 2001) što se može videti na slikama 8, 9 i 10. Regeneracija respiratornog epitela traje barem 3 nedelje (van Maanen i Cullinane, 2002.).



*Slika 8. Efekti infekcije konjskim virusom influence na cilijalni respiratorni epitel – zdrav epitel prekriven cilijama (Daly i Mumford 2001.).*



*Slika 9. Efekti infekcije konjskim virusom influence na cilijalni respiratorni epitel – 3 dana posle infekcije, cilije počinju na odumiru (Daly i Mumford 2001.).*

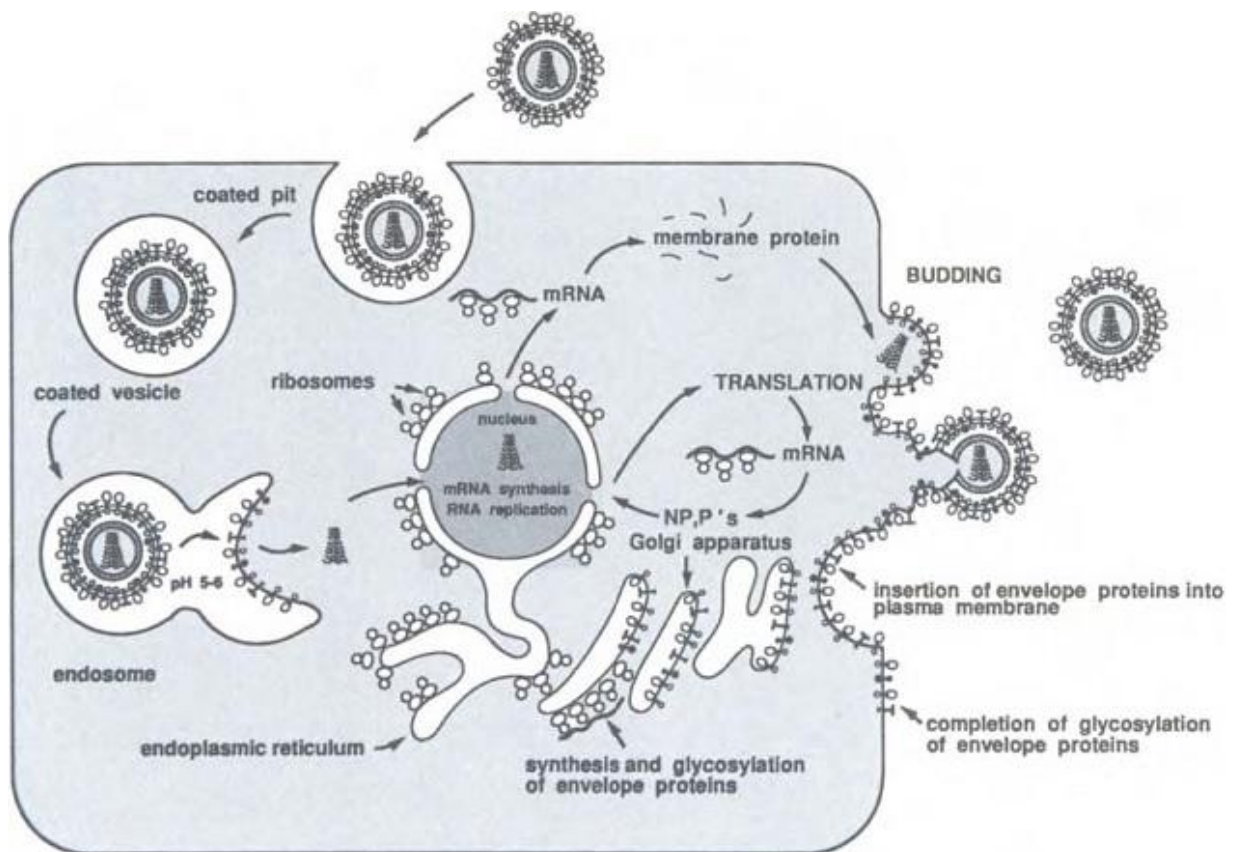


***Slika 10. Efekti infekcije konjskim virusom influence na cilijalni respiratorni epitel – 6 dana posle infekcije, počinju da se pojavljuju velike površine decilijalizovanog epitela (Daly i Mumford 2001.).***

Viralna replikacija rezultira oštećenjem cilija, hiperemijom, edemom, nekrozom i deskvamacijom i erozijom epitelnih ćelija (Coggin, 1979.). Kao rezultat toga, mehanizam mukocilijarnog čišćenja je ugrožen a trahealno čišćenje može biti smanjeno i do 32 dana nakon infekcije (Willoughby i sar., 1992.). Pored toga smanjena je i funkcija alveolarnih makrofaga (Kobluk i sar., 1995). Bronhitis i bronhiolitis, koji se tako razvijaju, sledi intersticijalna pneumonija koja je praćena kongestijom, edemom i neutrofilnom infiltracijom (Daly i Mumford 2001.). Kao moguć put razvoja oboljenja pominje se sekundarna bakterijska bronhopneumonija ili hiperreaktivni respiratorni sindrom kao rezultat oštećenja mehanizma čišćenja respiratornog trakta sa povećanom penetracijom bakterija ili alergena iz okoline (Beech i sar., 1991.). Virusi H3N8 izazivaju težu kliničku sliku od H7N7 virusa. Virusi suptipa H3N8 su više pneumotropni (Beneridge i sar., 1965.; Gerber, 1966.), a takođe su povezani sa izazivanjem miokarditisa (Gerber, 1970.).

Replikacija virusa influence je prikazana na slici 11 a odvija se u nekoliko koraka (1) Adsorption - adsorpcija: virus dolazi u interakciju sa ćelijskim receptorima koji sadrže sialičnu kiselinu i preko hemaglutinina ulazi u ćeliju. (2) Fusion and uncoating – fuzija i ogoljavanje: hemaglutinin podleže konformacijskoj promeni koja je posredovana kiselim sredinom u endozomu, što dovodi do fuzije viralne i ćelijske membrane.

Ribonukleoproteinski kompleks se transportuje u nukleus. (3) Transcription and replication – transkripcija i replikacija: viralni RNK se transkribuje i replicira u nukleusu pomoću viralne RNK polimeraze. Dve različite vrste RNK se sintetišu iz viralnog RNK šablona: (a) pune dužine, pozitivna - replikativna intermediativna RNK, koja koristi polimeraze kod produkcije virionske RNK i (b) mRNK. (4) Translation - translacija: mRNK se transliraju u citoplazmi radi formiranja viralnih proteina. Membranski proteini (hemaglutinini, neuraminidaze i M2) se transportuju do plazma membrane. Viralni proteini poseduju nuklearne signale (PB1, PB2, PA, NP, M1, NS1 i NS2) i oni bivaju transportovani u nukleus. (5) Packaging and budding – pakovanje i pupljenje: novo sintetisani membranski proteini olakšavaju transport nukleokapsida iz nukleusa u citoplazmu, gde interaguju sa proteinima viralne membrane koji su već ubačeni u zakrpu u plazma membrani. Virioni pupe sa ćelijske membrane domaćina.



Slika 11: Replikacija virusa influence (Lamb i sar., 1996.).



## **2.4. Klinička slika i patomorfološki nalaz**

### **2.4.1. Klinička slika**

Klinički znaci infekcije sa virusom influence su obimno opisani posle prvog otkrića ovog virusa (Gerber, 1970.), i isti klinički nalaz se može naći i sada – 40-tak godina kasnije. Kao rezultat viralnog oštećenja mukoze konji iskazuju kliničke znake tipičnog virusnog respiratornog oboljenja (Kobluk i sar., 1995.). Klinički znaci kod životinja koje su imuno nekompetentne u pogledu influence su lako prepoznatljivi. Znaci bolesti se tipično uočavaju 48 sati a ponekad i samo 24 sata posle izlaganja virusu bilo da se radi o prirodno ili eksperimentalno izazvanoj infekciji (Landolt i sar., 2014.). Drugi autori navode da se influenza odlikuje iznenadnim početkom, sa inkubacionim periodom od jednog do 3 dana (Daly i Mumford 2001.). Prvi znak je povišena telesna temperatura (do 41 °C), koja je obično dvofazna, odnosno sa dva povišenja i to 48h i 96h posle infekcije ali ono može nastati i 7 dana posle infekcije (Sellon i Long, 2014.). Iscedak iz nosa je u početku serozan a počinje da bude tipično mukopurulentan 72h do 96h posle infekcije (Landolt i sar., 2014.). Zatim sledi duboki suvi kašalj, putem kojeg se izbacuju velike količine virusa u atmosferu, a koji je često praćen seroznim iscedkom iz nosa, koji može postati mukopurulentan zbog sekundarne bakterijske infekcije. Najučestaliji navedeni klinički znaci, kod drugih autora, su visoka temperatura, mukopurulentan nosni iscedak i spontani kašalj (Legrand i sar., 2013.). Efekti infekcije sa virusom influence kod magaraca i mula su tipično mnogo ozbiljniji nego kod konja i mogu dovesti do uginuća (Newton i Mumford, 2005.). Na slici 12 je prikazan konj sa seroznim nazalnim iscedkom.



***Slika 12. Serozni nazali iscedak tipičan za konje sa akutnom infekcijom sa influenza virusom (Sellon i Long, 2014.).***

Drugi najčešći klinički znaci koji se uočavaju su: mijalgija, uvećanje submandibularnih limfnih čvorova i inapetanca. Retrofaringealna limfadenopatija udružena sa tahipneom je varijabilni ali ne i čest nalaz (Landolt i sar., 2014.). Neki autori navode i kombinaciju sledećih kliničkih simptoma – visoka rektalna temperatura, inapetenca, konjuktivitis, crvenilo nazalne mukoze, serozni do mukopurulentni nazalni sekret i težak suv kašalj (El-Rahim i Hussein, 2004.) Ponekad se javlju edemi na nogama i skrotumu kao i spastične kolike. Zabeleženo je i gubitak telesne mase (Sellon i Long, 2014.).

Ozbiljnost bolesti zavisi od doze, soja virusa, virulencije i drugih faktora kao i od imunološkog statusa konja (Mumford i sar., 1988.; Mumford i sar., 1990.). Tako je zabeleženo da je kod većine nevakcinisanih konja telesna temperatura povišena na više od 39.5°C dok je kod većine vakcinisanih konja telesna temperatura niža 39.5°C prilikom infekcije sa istim virusom (Legrand i sar., 2013.). Međutim neka istraživanja su pokazala da nema razlike u kliničkoj slici koja je nastala tokom infekcije virusima koji pripadaju kladi 1 odnosno kladi 2 (Gildea i sar., 2011.).

Klinički znaci kod životinja koje su stekle delimičan imunitet na virus influence, bilo da su prethodno vakcinisane ili su bile ranije u kontaktu sa virusom, obično se teže

prepoznaju a to su pre svega slab kašalj i/ili pireksija (Jaeschke i Lange, 1993.; Newton i Mumford, 1995.). Prepoznavanje subkliničke forme oboljenja sa širenjem virusa je uočeno kod prethodno vakcinisanih konja koji na taj način predstavljaju izvor kontaminacija (Newton i Mumford, 2005.). Dok je širenje infekcije kroz grupu imuno nekompetentnih životinja uvek brzo, klinički znaci infekcije kod vakcinisanih konja se obično pojavljuju tek za 18 dana po infekciji (Powell i sar., 1995.). Drugi autori navode da prosečan inkubacioni period kod nevakcinisanih konja iznosi  $2.5 \pm 0.50$  dana, zatim kod neredovno vakcinisanih  $3.0 \pm 0.41$  dana a kod redovno vakcinisanih 5 dana (Gildea i sar., 2011.).

Takođe poznati su slučajevi pozitivne dijagnoze (izolacijom, serološki) influence bez kliničke slike i bez širenja na druge životinje u štalama punokrvnih trkačkih konja (Daly i Mumford 2001.). Klinička slika zavisi od starosti, tokom prirodne infekcije u Alžiru kod 325 konja stopa morbiditeta od 14,9% je zabeležena kod konja do 15 meseci starosti, 4,95% kod konja preko 8 godina ali je bio 100% kod konji starosti između 18 meseci i 7 godina (Laabassi, 2015.).

Konji se obično oporave od nekomplikovane influence u roku od 10 dana, jedini simptom koji može trajati duže je kašalj. Tako pojedini autori navode da je prosečno trajanje kliničkih znakova od 7 do 14 dana kod ne komplikovanih slučajeva a da se kašalj može javljati još do 21. dana (Landolt i sar., 2014.). Drugi autori navode da je prosečno trajanje kliničkih znakova kod vakcinisanih konja je  $7.7 \pm 0.67$  dana, što je značajno manje od  $14.4 \pm 0.40$  dana kod nevakcinisanih konja (Gildea i sar., 2011.). Ako se javi sekundarna bakterijska infekcija može se produžiti period oporavka i posle 14. dana jer se tada radi o perzistentnom respiratornom oboljenju (Landolt i sar., 2014.). Kod ozbiljnih infekcija, auskultacijom pluća mogu se dijagnostifikovati izdužene amplitude, ponekad sa dodatnim šumovima koji se mogu čuti (Sellon i Long, 2014.). Klinička slika bolesti može se drastično pogoršati ukoliko se obolela životinja podvrgne makar i lakom treningu ili radu što obično dovodi do povećanog gubitka telesne mase i pojačanja drugih simptoma (Gross i sar., 1998.). Zbog toga više autora navodi da treba odmah po pojavi kliničkih simptoma uvesti mirovanje životinja kako bi se smanjila ozbiljnost kliničkih simptoma i trajanje bolesti kao i pojava mogućih komplikacija kao što su pneumonija i faringitis (Knowles i King, 1963.; Miller, 1965.; McQueen i sar., 1968.; Gerber, 1970.; Liu, 1983.; Powell, 1987., 1991.; Beech, 1991.; Coggins, 1991.; Mumford, 1992.). U tabeli 1 u prikazani rezultati oglada sa konjima u treningu i bez njega a koji su inficirani sa virusom influence.

**Tabela 1. Prikaz dužine trajanja kliničkih simptoma u danima posle infekcije kod konja su bili u treningu i bez njega. Broj životinja u grupi je 4 (Gross i sar., 1998.).**

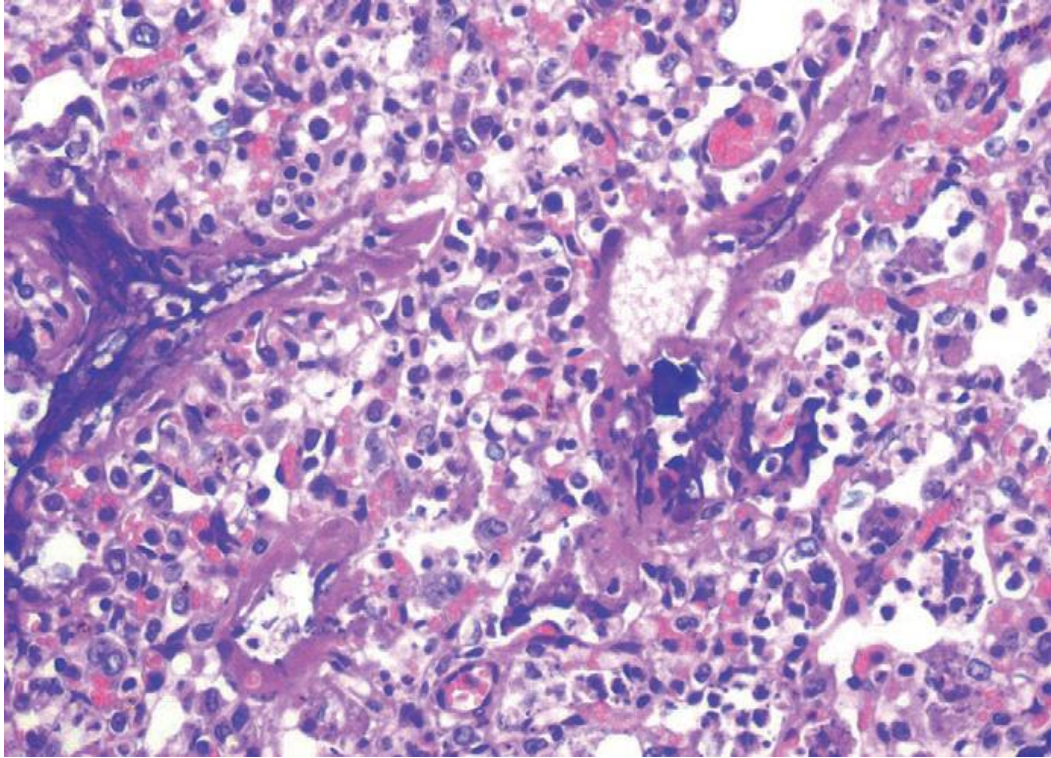
Klinički znak	Broj životinja u grupi sa kliničkim znakom		Broj dana posle infekcije	
	Sa vežbanjem	Bez vežbanja	Sa vežbanjem	Bez vežbanja
<b>Anoreksija</b>	4	3	2-9	3-8
<b>Depresija</b>	3	1	4-9	2
<b>Mukopurulentni nosni iscedak</b>	4	4	1-17	2-16
<b>Kašalj</b>	4	4	1-13	1-12
<b>Pireksija (&gt;38.5°C)</b>	4	4	1-11	1-11
<b>Tahikardija (&gt;50/min)</b>	4	4	1-17	2-17
<b>Tahipnea (&gt;30/min)</b>	4	4	1-14	1-14
<b>Patološki šumovi na plućima</b>	4	4	1-18	2-15
<b>Gubitak telesne mase</b>	4	4	4-28	4-17

Sekvele koje se javljaju kod influence kopitara obično se mogu podvesti pod hroničnim faringitisom, hroničnim bronhiolitisom i/ili alveolarnim emfizemom, koji dalje mogu doprineti razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća (COPD) odnosno inflamatorne bolesti vazdušnih puteva (IAD), sinuzitisa i infekcija vazdušnih kesica. U dijagnostici ovakvih slučajeva može se koristiti ultrazvučna dijagnostika toraksa da bi se demonstrirala plućna konsolidacija; kako pneumonija obično nastaje između 7 i 14 dana posle infekcije upotreba ultrazvuka je preporučljiva kod dugotrajnih slučajeva i upornih infekcija (Gross i sar., 1998.).

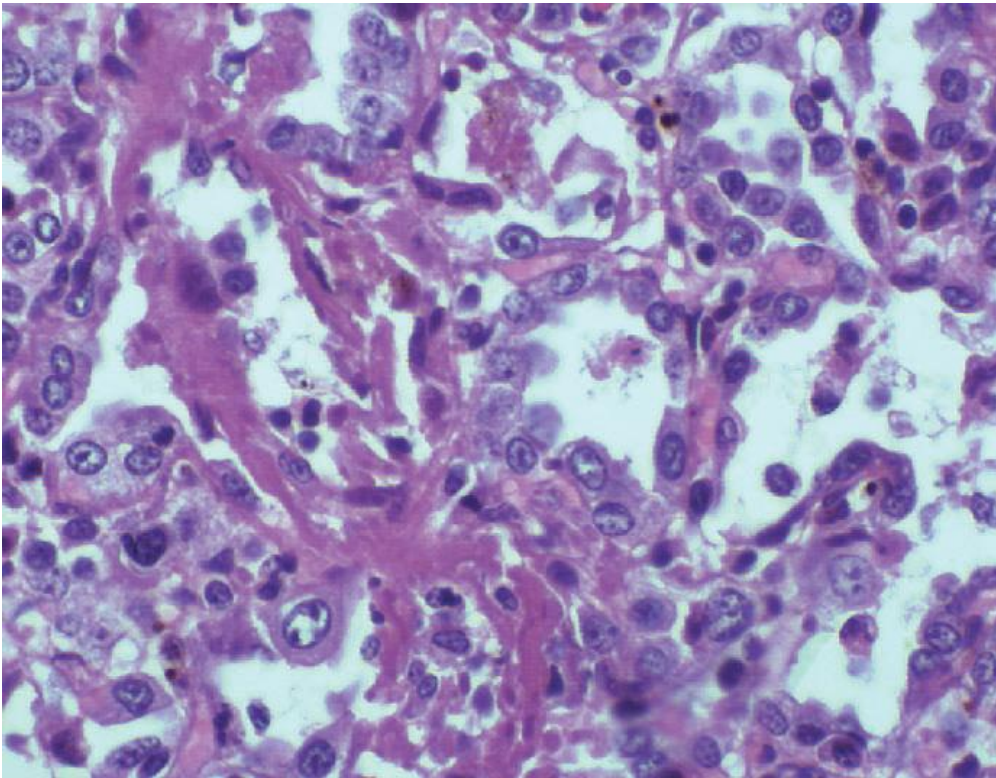
Relativno visoke stope smrtnosti zabeležene su kod ždrebad, životinja u lošoj kondiciji i kod magaraca (Daly i Mumford 2001.). Nedostatak majčinih antitela, iz bilo kog razloga, u vreme izloženosti virusom, kod mlade ždrebadi može pogodovati razvoju virusna pneumonije koja često vrlo brzo dovodi do smrti (Miller, 1965.). Kod neonatalnih infekcija dolazi do razvijanja ozbiljnih bronhijalnih i intersticijalnih pneumonija koje dovode do uginuća ždrebadi (Peek i sar., 2004.). Uginuća među odraslim životinjama su obično posledica sekundarne bakterijske infekcije koja dovodi do pneumonije, pleuritisa ili purpore hemoragike.

### **2.4.2. Patomorfološki i patofiziološki nalaz**

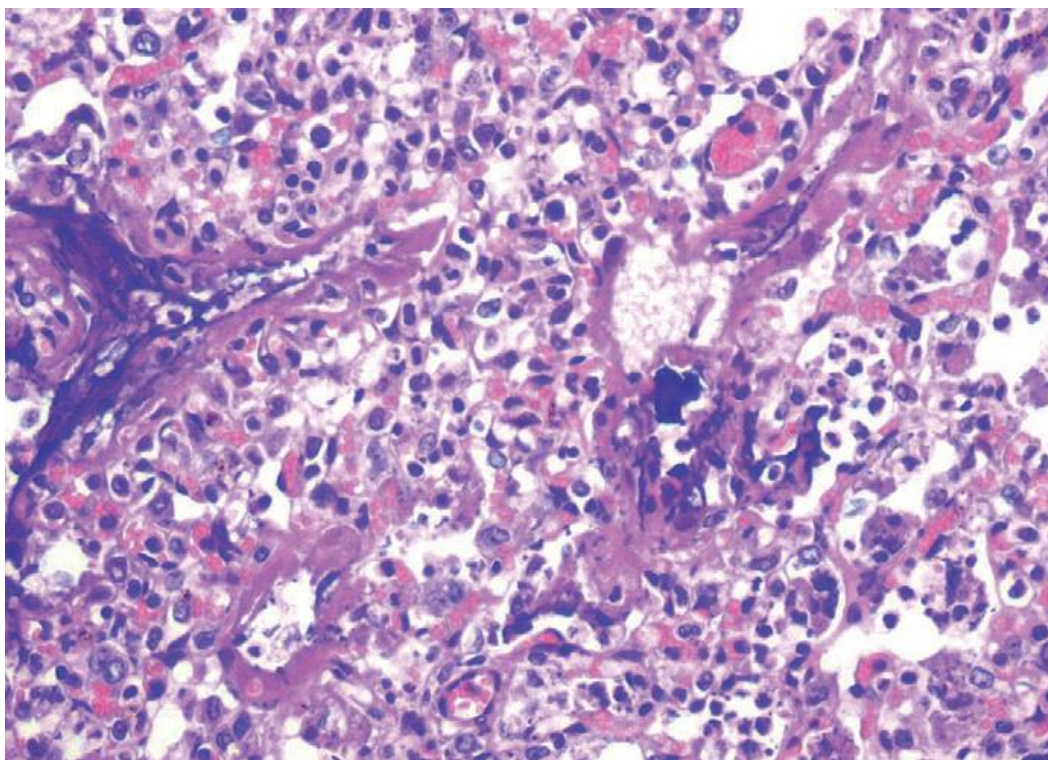
Relativno nizak mortalitet koje vezan za infekciju konja sa virusom influence odgovoran je za mali broj izveštaja koji govore o velikim patološkim nalazima i oni su uglavnom vezani za rane izveštaje o infekcijama konja sa virusom influence (Gerber, 1970.). Tako su dijagnostikovane subakutne inflamatorne bolesti nazalne mukoze, farinksa, larinksa i traheje (Landolt i sar., 2014.). Promena na plućima obično obuhvataju bronhitis, peribronhitis i perivaskulitis sa subakutnom intersticijalnom pneumonijom, edemom i fokalnom bronhopneumonijom. Po nekada se može naći i miokarditis. Neonatalna infekcija sa virusom influence može rezultirati sa fatalnim bronhointersticijalnim pneumonijama praćenim sa pulmonarnom kongestijom, traheitisom, bronhiolarnom i alveolarnom nekrozom i skvamoznim metaplazijama iako su ovakvi slučajevi retki (Begg i sar., 2011., Britton i Robinson, 2002., Patterson – Kane i sar., 2008.). Neki od mogućih patohistoloških nalaza koji se mogu post mortem naći kod konja kod kojih je dijagnostifikovana infekcija sa virusom influence su prikazani na slikama 13,14 i 15.



*Slika 13. Isečak pluća desetodnevnog ždrebeta sa znacima akutne bronhointersticijalne pneumonije sa alveolarnom nekrozom, hijalnim membranama, mešanom infiltracijom neutrofila i makrofaga koja je rezultirala plućnom konsolidacijom (200X; H&E) (Begg i sar., 2011.).*



***Slika 14. Isečak pluća desetodnevnog ždrebeta sa znacima subakutnog bronhointersticijalnom pneumonijom sa tip 2 pneumocitnom proliferacijom, makrofagnom aktivacijom i organizacijom hijaline membrane (400X; H&E) (Begg i sar., 2011.).***



***Slika 15. Isečak bronchusa devetodnevnog sa znacima subacutnog bronhitisa sa luminalnom nekrotičnom slojem ćelija, hiperplazijom epitela i retkim površinskim limfocitima i neutrofilima (400X; H&E) (Begg i sar., 2011.).***

Biopsija nosnog i bronhijalnog dela respiratornog trakta otkrivaju degeneraciju i dekvamaciju epitelnih ćelija i inicijalno infiltraciju neutrofila u disajnim putevima. Ovi neutrofili igraju važnu ulogu u patofiziologiji influence zato što izazivaju sužavanje terminalnih bronha i bronhiola (Reeth, 2000.).

Smatra se da tako zvani rani citokini prouzrokuju mnoge kliničke znake, jer su oni odgovorni za lokalnu inflamatornu reakciju kao i za neke sistemske efekte. Za najvažnije se smatraju interferon -  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ), tumor nekrosis faktor -  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) i interleukin-1 (IL-1), za njima slede IL-6 i brojni hemotraktni citokini, kao što su neutrofilprivlačući interleukin-8 (IL-8), makrofagni inflamatorni proteini (MIPs), i monocit hemoprivlačni proteini (MCPs) (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Virusne infekcije se najčešće manifestuju promenama broju ćelija bele krvne loze i to vidu limfopenije i neutropenije i ponekad limfocitoze (Townsend i sar, 1997.). Hematološki nalaz kod infekcije sa ekvinim virusom influence obuhvata umerenu normocitnu, normohromnu anemiju (Gerber, 1970.). U prirodnim i eksperimentalnim infekcijama



dokazano je smanje broja leukocita tokom celog perioda bolesti dok je broj eritrocita smanjen samo na početku bolesti (Krumrych i sar., 1999.). Leukogram tipično pokazuje leukopeniju koja obično nastaje kao posledica neutropenije i limfopenije sa trajanjem od 3 do 5 dana (Nelson, 1995.). Neutropenija nije uobičajeni nalaz a odnos neutrofilija/limfocita je obično povećan tokom ovog perioda (Matroshovich i sar., 2004.). Monocitoza tokom rane kovalescencije je varijabilni nalaz (Martin i sar., 1959.).

### ***2.4.3. Hronične bolesti koje mogu nastati kao posledica influence***

Infekcije i zapaljenja donjeg dela respiratornog trakta su česte kod konja. Iako se etiološki mogu razlikovati, klinička slika im je često zajednička. Ona može biti ograničena na netolerantnost na trening, loše performanse, ili oboleli konji mogu kašljati ili imati bilateralni nosni iscedak za vreme ili odmah posle vežbanja. Kako bolest napreduje klinički znaci mogu napredovati u različim pravcima tako da može nastati kombinacija nekoliko kliničkih znakova koji mogu obuhvatati groznicu, anoreksiju, depresiju, bilateralni nosni iscedak, kašalj, gubitak težine, tahipneju, i respiratorni distres (Giguère, 2010.). Inflamacija niskog stepena malih disajnih puteva je prepoznata kao čest uzrok lošeg rada kod mladih i srednje starih sportskih konja. Tek od nedavno je uspostavljena razlika između rekurentne opstrukcije disajnih puteva (eng. RAO) i inflamatornog oboljenja disajnih puteva (eng. IAD) (Mazan, 2010.). Rekurentna opstrukcija disajnih puteva je jedna od najstarijih poznatih bolesti konja ali njena patogeneza i etiologija još uvek nisu razjašnjene (Wysocka i Klucinski, 2014.), bolest se često definiše i kao hronični alergijski bronhitis. Bolest je dijagnostikovana kod životinja starijih od 6 godina i smatra se da ima naslednu osnovu (Gerber i sar., 2009.). Prema konzensusu iz 2007. (Couetil i sar., 2007.) inflamatorno oboljenje disajnih puteva je neinfektivno, hronično oboljenje donjih partija disajnih puteva koje se karakteriše lošim sportskim rezultatima i kašljem bez dispeneje. Etiologija je za sada nepoznata, ali infektivni agensi i alergeni nisu isključeni (Laus i sar., 2009.).

Neki autori sugerišu da su hronična opstruktivna bolest pluća (eng. COPD), rekurentna opstrukcija disajnih puteva (RAO), alergijska bolest disajnih puteva, inflamatorno oboljenje disajnih puteva (IAD), bolest malih disajnih puteva, reaktivna bolest disajnih puteva, bronhitis i bronhiolitis deo istog entiteta i ovi termini mogu biti tretirani kao manje ili

više adekvatani za opisivanje ove upale (Robinson, 2008.). Patogeneza inflamatornog oboljenja disajnih puteva je slabo definisana. Mnoštvo etioloških faktora može biti uključeno i njihov relativni doprinos razvoju bolesti varira između različitih populacija konja a na osnovu ishrane, smeštaja i preventivne medicine prakse kao različite distribucije infektivnih agenasa i genetskih uticaja (Laurent i sar., 2007.).

Neki autori ističu da su za nastanak hronične opstruktivne bolesti pluća (COPD) najvažnije virusne i bakterijske infekcije, što je kod ljudi i potvrđeno (Trailović i sar., 2011.). Naime, poznato je da virusne i bakterijske infekcije dovode do oštećenja disajnog epitela, a time i do povećane reaktivnosti bronhija, prodiranja alergena i iritanata. Preosetljivost na alergene, dakle, može nastati kao posledica prethodnih nelečenih ili nedovoljno izlečenih bakterijskih i virusnih infekcija.

Inflamatorni odgovor je praćen povećanjem nivoa histamina u bronhoalveolarnoj tečnosti, povećanjem nivoa inflamatornih medijatora u plazmi - tromboksana i 15-hidroksieikosatetraenoicidne kiseline (15-HETE) i smanjenje u proizvodnji prostaglandina (PG) E2 od strane respiratorne mukoze (Robinson, 2008.; Robinson i sar., 1996.).

Neinfektivni agensi imaju verovatno centralnu ulogu u razvoju hroničnih oboljenja pluća. Konji smešteni u štalama su potencijalno izloženi visokim koncentracijama erosolizovanih čestica i gasova i to kumulativno. Nekoliko studija je identifikovalo uvođenje konja u štalu kao faktor rizika za pojavu inflamatornih oboljenja disajnih puteva (Clarke, 1987.) zajedno sa visokim koncentracijama prašine koja je česta u okruženju konvencionalnih štala (Laurent i sar., 2007.; McGorum i sar., 1998.).

Histološki nalazi u konja sa bronhopneumonijom uključuju kontaminirana pluća sa brojnim intra alveolarnim i nešto manje brojnim intrabronhiolarnim neutrofilima pomešanih sa makrofazima, fibrinom, i akutnim hemoragijama (DebRoy i sar., 2008.). Studije sprovedene na klanicama su pokazale da postoji i do 37% konja sa histopatološkim dokazima upale disajnih puteva (Derksen i sar., 1989.; Winder i sar., 1991.). Takođe, prisustvo mukusa je dijagnostikovano u visokom nivou, skoro kod svih konja (94,12%) sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (Marinković i sar., 2007.).

#### ***2.4.4. Patogenost virusa influenzae kod kopitara***

Epidemija iz 2003. godine dovela je do ponovnog ispitivanja potencijalnog uticaja ograničenog antigenskog drifta na efikasnost vakcine i otvorio mnoga pitanja o drugim faktorima, kao što je patogenost, koja može definisati epidemijski potencijal jednog soja virusa influenzae. Tokom epidemije, bilo je izveštaja o neuobičajeno teškoj kliničkoj slici, posebno se radilo o kašalju kod nevakcinisanih životinja pa čak i među vakcinisanim životinjama (Newton i sar., 2006.).

Klinička slika kod nevakcinisanih kontrolnih životinja tokom eksperimentalne vakcinacije može da varira u zavisnosti od soja korišćenog u eksperimentalnoj infekciji (Daly i sar., 2011.).

U svakoj od ovih studija, infekcija je izazvana preko aerosola, korišćenjem DeVilbiss-ovog nebulajzera. Nazofaringealni brisevi su korišćeni za detekciju izlučivanja virusa (determinacija pomoću izolacije virusa je rađena na embrioniranim kokošijim jajima) svakodnevno su uzimani uzorci tokom 10 dana a klinički znaci, uključujući i kašalj i rektalnu temperaturu, svakodnevno su praćeni tokom 14 dana nakon infekcije.

Ovo zapažanje su podržali prikupljenji podaci iz 14 studija koje uključuju četiri različita prototipa sojeva virusa influenzae kopitara (tabela 2).

**Tabela 2. Dužina trajanja izlučivanja virusa i kliničkih znakova posle eksperimentalne infekcije ponija sa različitim konjski H3N8 sojevima virusa influence (Daly i sar., 2010.).**

Osnovne informacije	Srednje trajanje u danima (95% intervali poverenja) <sup>1</sup>				
	Soj virusa	Doze <sup>2</sup>	Broj Ponija	Izlučivanje virusa	Pireksija
Sussek/1989	8,6	31	5,1 (4.86-5.34)	4,9 (4.03-5.77)	4,9 (3.82-5.98)
Newmarket/1/93	8.9/9.0	21	5,3 (4.86-5.74)	2,1 (1.22-2.98)	2,6 (1.38-3.82)
Newmarket/2/93	10,5	22	4,8 (4.03-5.57)	1,9 (1.01-2.79)	2,9 (1.36-4.44)
Newmarket/5/03	8,9	17	5,2 (4.61-5.79)	3,6 (2.05-5.15)	10,4 (9.22-11.58)

<sup>1</sup> non-preklapaju 95% intervali poverenja ukazuju statistički značajnu razliku u parametru između sojeva

<sup>2</sup> Log 10 50% jajnih infektivne doze u aerosolu inokuluma.

Iako postoje ograničenja kod upoređivanja podataka iz različitih studija koje su sprovedene u različitim vremenima uz korišćenje različitih doza virusa, nije bilo značajne razlike u dužini trajanja izlučivanja virusa između sojeva. Nasuprot tome, period pireksije izazvan sa dva izolata iz 1993.godine je bio kraći nego kod sojeva iz 1989. i 2003. godine. Osim toga, izveštaji sa terena tokom epidemije iz 2003. godine govore da je kašalj bio najznačajniji simptom infekcije (Newton i sar., 2006.), što je potvrđeno značajno dužim trajanjem kašlja posle eksperimentalne infekcije sa sojem Newmarket/5/03 u poređenju sa tri starija izolata (Tabela 2).

Wattrang i sar. (2003) ispitivali su produkciju citokina povezanih sa pro-inflamatornih imunskim odgovorom kod dve grupe od po 10 ponija inficiranih sa sojevima Sussex/1989 ili Newmarket/2/93. Kao što se očekivalo, na osnovu ranijih zapažanja, poniji zaraženi sa sojem Sussex/1989 ispoljavali su najizraženije kliničke znake (Wattrang i sar., 2003.). Aktivnost interferona tipa I je detektovana u nosnog sekretu svih ponija inficiranih sa Sussex/1989, ali samo kod dva ponija zaraženih sa Newmarket/2/93. Aktivnost IL-6 je detektovan u nosnom sekretu kod svih ponija počevši od drugog dana pa nadalje, ali je ta aktivnost IL-6 bila značajno viša kod posmatranih ponija zaraženih sa sojem Sussex/1989 (Wattrang i sar., 2003.). Ovo podržava tvrdnju da su, kao što je slučaj sa virusom influence kod drugih vrsta

(van Reeth, 2000.), klinički znaci infekcije povezani sa trajanjem i nivoom citokina, više nego sa nivoom virusne replikacije.

Oba soja izolovana u Njumarketu 1993. godine, uprkos tome što su iz različitih linija prema filogenetskoj analizi HA gena, bila su iz manjih epidemija kada su oboleli samo konji u jednoj ili dve štale. Nasuprot tome, dva soja koji su prouzrokovala težu kliničku bolest (Sussex/1989 i Newmarket/5/03) bili su reprezentativni sojevi koji su izazvali široko rasprostranjene epidemije širom Evrope, ali su takođe pripadali različitim linijama HA. Ovo sugeriše da iako karakterizacija HA virusa može da ukaže da li može doći do proboja vakcinalne zaštite, to nije nužni pokazatelj patogenosti virusa i/ili njegove sposobnosti za širenje. Patogenost virusa je multigenetska osobina (Wright i sar., 2007.), tako da se sekvenciranje drugih gena, pored kodiranja HA, sve više primenjuje u nadzoru humane i influence kopitara.

## ***2.5. Postupak uzorkovanja krvi i nazalnih briseva***

Uzorke treba uzeti ubrzo posle pojave kliničkih znakova a najkasnije 6 dana od njihove pojave jer posle toga nastaje potpuna decilizacija gornjih partija respiratornog trakta pa je teško pronaći virus u tom periodu. Pod uzorcima se misli na uzorke nazofaringealnog brisa i uzorke krvi. Kod izbora grla za uzorkovanje treba birati konje sa najakutnijim i najtežim znacima bolesti, a to su obično mladi nevakcinisani konji. Takođe treba obratiti pažnju na sumnjive subklinički inficirane virusonoše, npr. novi konj u štali, konji vraćeni sa trka, izložbi i sl. Što se tiče broja uzoraka, treba znati da je pozitivana dijagnoza postavljena kod jednog obolelog konja dovoljna da se počne primenjivati strategija za sprečavanje zaraze.

Nazofaringealni bris treba uzeti sa bilo kojeg konja koji pokazuje kliničke znake bolesti. Nevakcinisani konji, odnosno konji bez zaštitnih antitela, će proizvoditi velike količine virusa u respiratornim sekretima tokom 4 do 10 dana, dok će konji koji su prethodno bili izloženi virusnim antigenima, bilo vakcinalnim ili nakon prirodne infekcije sa divljim sojevima virusa influence, proizvoditi manje količine virusa i to tokom kraćeg vremena (Van Maanen i Cullinane, 2002.). Najbolje je bris uzeti u roku od 24 sata nakon pojave groznice i to zajedno sa ćelijama mukoze, jer se visoke koncentracije virusa nalaze unutar ćelija sluzokože. Nazofaringealni bris se stavlja direktno u transportni medijim za viruse, koji

sadrži teleći serum i antimikrobna sredstava. Ako se bris nemože testirati odmah, uzorak treba ohladiti na temperaturu frižidera i testirati u roku od 24 sata, ili zamrznuti ako će procedura trajati duže od 24 sata.

U uzorcima koji su dobijeni bronhoalveolarnom lavažom i transtrahealnom aspiracijom mogu se dokazati virusi izolacijom ili detekcijom virusnih antigena, međutim ovi testovi se ne koriste u rutinskoj dijagnostici influence kopitara. Postoje jeftinije i manje invazivne procedure za dijagnostiku infekcije virusom influence. Citologija i bakterijske kulture mogu biti značajne ako se razvije sekundarna bakterijska infekcija ili postoji sumnja na postojanje inflamatornog procesa.

## ***2.6. Dijagnostika***

Influenca ima karakteristiku da se širi brzo, dakle, veterinari moraju delovati brzo čim se postavi sumnja na infekciju, kako bi se sprečila mogućnost širenja bolesti (Myers i Wilson, 2006). Brza i pouzdana dijagnostika odnosno izolacija sumnjivih jedinki predstavljaju prvu liniju odbrane protiv epidemija influence kopitara. Prepoznavanje kliničkih znakova (groznica, depresija, oštar kašalj i sekret iz nosa) uz poznavanje epizotoloških podataka daje osnov za rano otkrivanje infekcije. U nekim slučajevima kašalj i brzo širenje simptoma kašlja u grupi konja koji su ili nevakcinisani protiv virusa influence ili nisu bili u kontaktu sa virusom influence mogu jasno ukazati na influencu (Kobluk i sar., 1995). Činjenice na koje treba obratiti pažnju tokom epizotološke ankete obuhvataju vakcinalni status, starost konja, zoohigijenske uslove, i mogućnost nedavnog izlaganja virusu - putovanja, izložbe, trke, novi konj u štali i sl. Konačna dijagnoza se može postaviti kroz različite korake, koji obuhvataju klinički pregled, brzi terenski test, hematološki nalaz i nekoliko različitih seroloških i izolacionih testova.

Nekoliko dijagnostičkih testova je dostupno za identifikaciju virusnog antigena. Brzi testovi poput Directigen™ Flu A ELISA (Becton Dickinson, Kanada) testa detektuju prisustvo nukleoproteinskog antigena, a rezultati se dobijaju u roku od 15 minuta. PCR (Polimeraze Chain Reaction) tehnike omogućavaju identifikaciju virusa u roku od 24 do 48 sati, dok je za izolaciju virusa potrebno nekoliko dana do nedelja. Studije pokazuju da je od svih testova PCR najsenzitivniji (Quinlivan i sar., 2004.). Neki autori (Chambers i sar., 1994.)

tvrde da je izolacija virusa osetljivija od ELISA testa, dok su drugi autori (Morley i sar., 1995.) imali poteškoće u izolaciji virusa u epidemiji, ali su ELISA testom dokazali prisustvo virusnog antigena. Smrzavanjem uzoraka smanjuje se i osetljivost izolacije virusa, međutim, na PCR i ELISA test smrzavanje će minimalno uticati jer oni mogu da detektuju i ne viabilni virus, odnosno virusne antigene.

### **2.6.1. Hematologija**

Kompletna krvna slika može pomoći u dijagnostici pokazivanjem jasnog trenda u određenim ključnim trenucima toka oboljenja, ali ima najveću vrednost u determinisanju prisustva sekundarnih bakterijskih respiratornih patogena (Kobluk i sar., 1995). Hematološki nalaz u ranim fazama oboljenja može otkriti blagu do umerenu normocitnu, normohromnu anemiju i leukopeniju sa umerenom do izraženom limfopenijom koja se održava tokom 1 do 5 dana (Myers i Wilson, 2006.). Monocitoza se može javiti u ranim fazama oboljenja. Ukoliko se javi sekundarna bakterijska infekcija dolazi do promenljive leukocitoze sa umerenom neutrofilijom i to obično između 3 i 7 dana, sa skretanjem u levo.

Ako se radi ispitivanje enzima koji se mogu naći u krvi, može se detektovati povišenje mišićnih enzima kao što su kreatin fosfokinaza ili aspartat transferaza ako se kod konja javlja bolnost u mišićima (Kobluk i sar., 1995). Fibrinogen je uglavnom u okviru fizioloških granica, osim u teškim slučajevima sa sekundarnom bakterijskom infekcijom. Amiloid kao protein u serumu je osetljiv inflamatorni marker koji se povećava tokom prvih 48 sati od infekcije a vraća se na bazalni nivo tokom perioda od 11 do 22 dana. Nivo proteina u serumu amiloida približno odgovara težini infekcije (Hulten i sar. 1999.). Biohemijski parametri krvi bi trebalo da budu u okviru fizioloških granica osim ako životinja nije pretrpela komplikacije kao što su dehidracija i inapetanca koja rezultira poremećajem metabolizma elektrolita i povećanju indirektna koncentracija bilirubina. Povećanje koncentracije mišićnih enzima kao što su kreatin kinaza, aspartat aminotransferaza i laktat dehidrogenaza javlja se kod onih konja koji razviju miozitis (Myers i Wilson, 2006.). Oboleli konji često pokazuju znake ukočenosti mišića ili upale mišića, a postoji i rizik od razvijanja teške rabdomiolize, mioglobinurije, i miokarditisa ako se konji koriste za obavljanje teških radova.

### 2.6.2. Serološki testovi

Infekcija sa virusom influence može se otkriti serološkim testovima na uparenim serumima i praćenjem porasta titra specifičnih antitela. Neki smatraju da analiza parnih seruma ima samo istorijski značaj, posebno kada postoje PCR, ELISA i izolacija virusa, ali je to i sada bio - dijagnostička tehnika izbora i rutinski se koristi u dijagnostici influence. Prvi od dva uparena uzorka seruma uzima se već u toku bolesti (akutne faza) i to što ranije moguće, a drugi uzorak seruma se uzima nakon 2 nedelje (rekoalescentna faza). Serum uzet tokom akutne faze treba zamrznuti i ispitivati zajedno sa drugim uzorkom, kako bi se smanjio uticaj varijabilnosti između testova. Nedavno vakcinisani konji mogu imati antitela koja ne preveniraju infekciju ili dalje prenošenje virusa, ali mogu da kompromituju serološku dijagnostiku (Kobluk i sar., 1995). Mlađi konji koji su manje imunološki sposobni mogu biti korisniji za serološko uzorkovanje ako su u kontaktu sa konjima koji su izloženi epizotiji jer je kod njih verovatnije da će doći do četvorostrukog ili većeg povećanja titra antitela.

Titar antitela može se meriti korišćenjem nekoliko testova i to testom inhibicije hemaglutinacije (HI) odnosno reakcija inhibicije hemaglutinacije (RIHA), virus neutralizujućim testom (VN), ili radijalnom hemolizom (SRH). Prema uputstvima Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja (OIE) postoje dve jednostavne metode, a to su test inhibicije hemaglutinacije (HI) i singl radijalna hemoliza (SRH), svaki jednako efikasan i u širokoj upotrebi, ali se može koristiti i test fiksacije komplementa (CF) koji nije u opštoj upotrebi (OIE, 2015.).

Ako je moguće, izolati od nedavnih slučajeva treba da bude uključeni. Zamrznuti post infektivni konjski antiserumi protiv A/eq/Newmarket/77 (H7N7), A/eq/Newmarket/1/93 (Američka linija H3N8), A/eq/Newmarket/2/93 (Evropska linija H3N8), A/eq/South Africa/4/03 (Florida grana 1, podlinija američke linije) i influenza negativan konjski serum, su dostupni kod Evropske direkcije za kvalitet medikamenata (EDQM). Ovim serumima su dodeljene SRH vrednosti preko internacionalne studije saradnje i mogu se koristiti kao primarna serumska referenca za testove (Daly i sar., 2007, Mamford, 2000.).

Potvrda influence se dobija kada je titar u drugom uzorku četiri ili više puta veći od akutnog titra (HI i VN testovi) ili ako je povećan za 50% ili 25 mm<sup>2</sup> za SRH test (Wood i sar., 1994.). Ukoliko se radi jednostuko testiranje testom inhibicije hemaglutinacije pozitivnim se smatraju rezultati  $\geq 10$  (Boliar i sar., 2006.). Tumačenje rezultata može biti



komplikovano kod konja koji već imaju visok vakcinalni titar ili su prethodno bili u kontaktu sa virusu, ili ako se kasni sa uzimanjem uzorka u akutnoj fazi. SRH test je reproducibilniji i osetljiviji od HI testa i može da razlikuje vakcinisane konje od nevakcinisanih. SRH test je komplikovaniji za rutinsku dijagnostiku i to zbog svakodnevne standardizacije i standardizacije potrebnih reagenasa, i manje se koristi u rutinskoj serološkoj dijagnostici influence kopitara od HI testa. Razvijen je i standardizovan ELISA test za detekciju antitela protiv hemaglutinina virusa influence; što će zajedno sa HI testom povećati osetljivost i specifičnost seroloških testova u potvrdnoj kliničkoj dijagnozi influence kopitara. (Sugiura i sar., 2001.). Razvijeni su i standardizovani testovi za dokaz antitela prema nestrukturim proteinskim antigenima virusa influence kao što je NS1 (Ozaki i sar. 2001.). Antitela na NS1 anitgen se ne proizvode nakon vakcinacije; tako da se ovaj test može koristiti za razlikovanje vakcinisanih od nevakcinisanih konja.

### ***2.6.3. Brzi test – Direktigen Flu A test***

Enzim-linked immunosorbent Assay (ELISA) - test za dijagnostiku virusa influence je prvobitno razvijen za ispitivanje epidemija gripa kod ljudi, a primenjuje sa uspehom za dijagnozu influence kod kopitara. Direktigen Flu A ELISA detektuje virusni nukleoprotein iz uzoraka nazofaringealnog brisa pomoću enzim-konjugovanih monoklonskih antitela. Direktigen test je manje osetljiv na niske titre virusa, npr. kod delimično imunih konja, kod onih sa blagom kliničkom slikom i kod onih koji izlučuju nizak nivo virusa. Tako pojedini autori (Chamber, 1994.) navode; da se ovim testom može otkriti 90% inficiranih grla kada se uzorkovanje obavlja u ranoj fazi bolesti. Drugi autori (Quinlivan i sar., 2004.) su identifikovali virus u 100% slučajeva kod inficiranih ždrebadi sa Evropskom sojem virusa H3N8, i pri tom nisu utvrdili visoku korelaciju između količine virusa u brisevima i sposobnosti Direktigen test za otkrivanje virusa. Studije kod ljudi su utvrdile da je dijagnostička osetljivost testa poboljšana kada se u uzorku nalaze i zaražene ćelije sluzokože (Myers i Wilson, 2006.). Posebna prednost ovakvog testa je što se rezultati dobijaju u roku od 15 minuta od postavljanja testa. Međutim, negativan rezultat definitivno ne isključuje prisustvo virusa influence.

Uprkos ovim nedostacima, u situaciji u kojoj je potrebno analizirati više uzoraka, antigen-capture ELISA je metod izbora za brzu detekciju virusa jer se osetljivost ove metode povećava sa većim brojem analiziranih uzoraka.

#### ***2.6.4. Lančana reakcija polimeraze - PCR (Polymerase chain reaction)***

Lančana reakcija polimeraze (PCR) - otkriva segmente od virusne RNK iz nazofaringealnog brisa. Pritome je veoma osetljiv test koji se sve više koristi u praksi. Jedna od prepreka za šire korišćenje PCR-a može biti njegova cena. Najčešće korišteni materijal za analizu predstavlja nosni sekret.

Real-time Light Cycler RT-PCR korišćenjem prajmera M52C (5'-CTT-CTA-ACC-GAG-GTC-GAA-ACG-3 ') i M253R (5'-AGG-OKU-TTT-TGG-ACA-AAG-CGT-CTA-3 ') dizajniran je tako da amplificira 244 bazna para nukleotida od 32 do 276 para u matriks genu, koji je veoma očuvan u virusima influence tipa A, a koji se pokazao kao osetljiviji za detekciju pozitivnih uzoraka iz virusne kulture u jajima ili otkrivanje nukleoproteina korišćenjem kompleta za detekciju humane influence (Tu i sar., 2009). Kombinacijom RT-PCR testa, baziranog na matriks genu a koji je razvijen za detekciju širokog spektra sojeva influence tipa A uključujući ptičiji H5N1, sa sistemom za automatsku DNK ekstrakciju stvoren je visoko propusni test koji se koristio u masovnom skrining programu kod konja tokom programa iskorenjavanja influence u Australiji tokom 2007. godine (Foord i sar., 2009.). Ova vrsta tehnologije se stalno razvija.

TaqMan® real-time RT-PCR testovi specifični za H3N8 i H7N7 suptipove influenza A virusa koji se pojavljuju kod konja su komercijalizovani RT-PCR kit-ovi za detekciju influence konja (Lu i dr., 2009). Ovi RT-PCR testovi još nisu potvrđeni u skladu sa validacijom testova usvojenom od strane Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja (OIE) (OIE, 2012). Iako se genetska sekvenca izolata može izvesti iz PCR testova veoma je bitno da se izolat infektivnog virusa dalje testira da bi se ispitala svojstva novih antigenskih izolata i izvršila evaluacija antigenskog drifta na terenu.

Reverzna transkriptaza - PCR (RT-PCR) tehnika obuhvata korišćenje PCR sa jednim setom prajmera iz nukleoproteina gena i jednim setom prajmera sa matricom gena. Ove tehnike su upoređivali Quinlivan i saradnici (2004.), koji su utvrdili da je osetljivija metoda

kada se koristi jedan set prajmera. Ovaj metod je takođe manje podložan kontaminaciji. Za PCR je utvrđeno da ima ekvivalentnu ili veću osetljivost od virusne izolacije. RT-PCR se koristi za sekvenciranje celog virusa, omogućavajući na taj način da se utvrdi suptip i soj. Ova tehnologija se može uspešno koristiti u programima nadzora pogotovu kada postoje teškoće sa izolacijom virusa.

Analizom pojedinih metoda dijagnostike drugi autori dobili su različite rezultate kada se uporede različite metode, tako su Pasick i saradnici (2007.) dobili pozitivan nalaz antitela na NP influenza A virusa kod gusaka i to kod 10 od 12 jedinki a kod jedne vrlo visoke titrove sa HI testom ali su svi brisevi obrađeni sa RT-PCR bili negativni sa zaključkom da se u trenutku uzimanja uzoraka nije radilo o aktivnoj infekciji. Takođe drugi autori su ima slične PCR negativne pacijente kod kojih je dokazan HI testom značajan porast titra antitela na influence tipa A ali je PCR bio negativan (Wallace i sar., 2004.).

Imuno-PCR tehnika kombinuje ELISA test sa PCR u cilju detekcije nestrukturnog NS1 protein i hemaglutinina virusa influence (Ozaki i sar. 2001.). Ustanovljeno je da imuno-PCR ima veću osetljivost nego RT-PCR. Ovaj test ipak nije u potpunosti razvijen i verovatno predstavlja budućnost ove dijagnostike.

### ***2.6.5. Izolacija virusa***

Izolacija virusa predstavlja dokazivanje virusa iz nazofaringealnog brisa, koji je transportovan u virusnom transportnom medijumu, i to inokulacijom i inkubacijom na embrioniranim kokošijim jajima ili pasažom preko kulture ćelija bubrega psa Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCKC). Sekret iz respiratornog trakta se može dobiti uz pomoć nazalnog brisa, traheobrahijalnog aspirata ili faringealnog brisa. Širenje virusa koincidira sa inicijalnom pojavom febre i može stati sa pojavom karakterističnih kliničkih znakova (Beech, 1991.). Uspešnost izolacije može se poboljšati uzorkovanjem od mlađih konja kao i od konja za koje se sumnja da su bili u dodiru sa virusom ali još nisu ispoljili karakterističnu kliničku sliku.

Izolacija virusa influence kopitara se najuspešnije vrši na 10-11 dana starim pilećim embrionima. Jaja se inokulišu sa 100 µl uzorka virusa u različitim razređenjima direktno u alantoisnu šupljinu a otvor se začepljuje voskom. Jaja se zatim inkubiraju 2 dana, a potom se

prebacuju na 4 °C tokom 4 sata pre nego što se može prikupiti virusna suspenzija (Newton 2008.).

Kada se radi sa embrioniranim jajima virus se otkriva pomoću metoda hemaglutinacije u okviru amniona ili alantoisa inficiranih jaja. Identitet virusa se zatim potvrđuje testom inhibicije hemaglutinacije korišćenjem specifičnog antiseruma za H3N8 i H7N7 virus. Izolacija virusa može biti korisna kada su drugi postupci kao što su ELISA ili PCR nedostupni, međutim, na rezultate se obično čeka nekoliko dana pa čak i nedelja. Izolacija virusa je jedina dijagnostička procedura kojom se virus može okarakterisati antigenski i genetski. Ovo je od vitalnog značaja za nadzor antigenkog drifta i šifta i može dati veoma važne podatke neophodne za izradu i ažuriranje vakcina. Ovde ipak treba biti oprezan jer se mutacija može desiti i tokom procesa izolacije virusa.

## **2.7. Vakcinacija**

Rutinska vakcinacija je primarni metod preventive influence kako u individualnom držanju tako i u velikim populacijama kopitara. Potrebno je da oko 70% kopitara u datoj populaciji bude potpuno imunizovano da bi se preveniralo izbijanje epizotije influence (Baker JD, 1986.). Smatra se da uspeh vakcinacije zavisi i od dobi ždrebadi prilikom prve imunizacije kako bi se uspostavio adekvatan nivo antitela (Fougerolle i sar., 2015.).

Vakcina koja se koristi u borbi protiv virusa influence predstavlja inaktivisanu vakcinu sa dva soja koja može biti kombinovana sa vakcinom protiv drugih virusa značajnih za kopitare. Vakcinacija je preporučeni metod borbe protiv infekcija a zaštita se obezbeđuje preko neutrališućih antitela (Mašić i sar., 2014.). Vakcinacija je ključ za kontrolu virusa influence A i mnoge zemlje sprovode obavezne programe vakcinacije za sportske konje (Perglione, 2015.). Većina velikih organizacija u svetu a koje se bave trkama punokrvnjaka imaju obavezne politike vakcinacije kako bi se smanjio ekonomski uticaj epidemija virusa ekvine influence.

Uprkos opsežnoj upotrebi vakcina, izbijanje bolesti se beleži i dalje (Bountouri i sar., 2011.). Usled antigenkog drifta između vakcinalnog i ciklušućeg soja moguća je pojava kliničkih znakova oboljenja i kod vakcinisanih i kod nevakcinisanih životinja (Barbić i sar., 2009.). Antigenki drift kompromituje efikasnost vakcina kao sposobnost vakcinalnih antitela

da prepoznaju terenski virus a samim time da štite životinju od kliničkih bolesti i da smanjuju širenje virusa (Gildea i sar., 2013.).

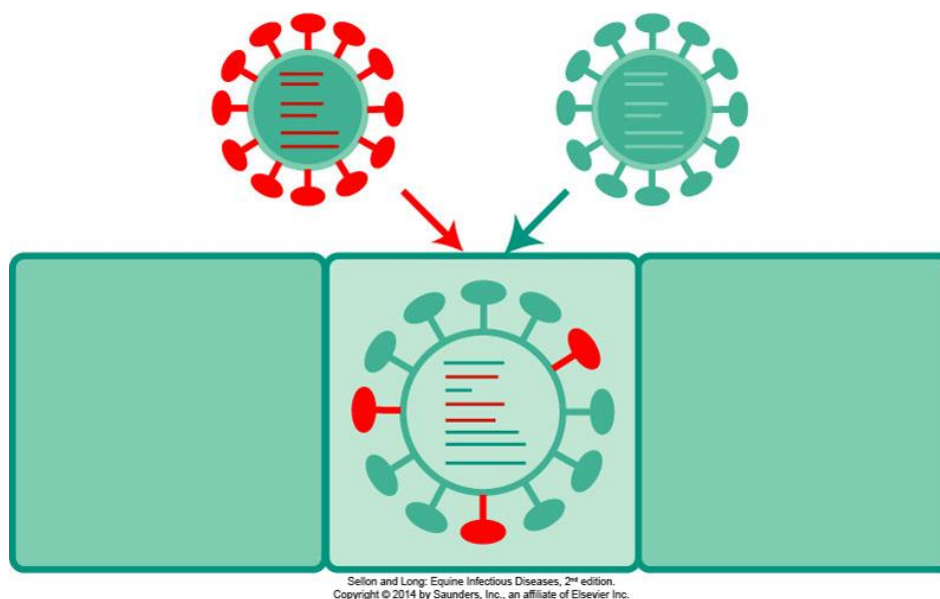
Drugi autori navode epizotiju iz 2003. godine u Velikoj Britaniji, kada je utvrđeno da je uzrok kliničkih respiratornih oboljenja među vakcinisanim i nevakcinisanim konjima različitih rasa i tipova na najmanje 12 lokacija u 21 štali sa oko 1300 trkačnih konja bio ekvini influence virusa (Newton i sar., 2006.). Isti autori navode da je tom prilikom bilo i konja koji su vakcinisani tokom trethodna tri meseca sa vakcinom koja je sadržala reprezentativne evropske (A/eq/Newmarket/2/93) i američke (A/eq/Newmarket/1/93) linije H3N8 suptipa influenza A virusa ali je cirkulišući virus bio mnogo bliži Američkoj subliniji Kentucky/5/02, samim tim došlo je i oboljevanja velikog broja konja. U drugima slučajevima unosa novog virusa iz Florida sublinije, koji se pojavio u Japanu 2007. godine i koji je izazvao morbiditet od 12,8% a epizotija je trajala 2 nedelje, vakcina je delimično zbog krosreaktivnosti zaštitila konja i smanjila morbiditet (Yamanaka, 2008.). Kod konja u Švedskoj 2011. godine, indetifikovani su virusi iz klada 1 i klada 2 Florida sublinije, koji su uneseni transportom konja, a koji su se širili kroz nevakcinisane mlade konje ali su i kod vakcinisanih konja izazivali kliničke znake respiratornog oboljenja (Back i sar., 2016.).

Vakcina se smatra generalno sigurnom ali konje ne treba vakcinisati najmanje 14 dana pre važnih takmičenja kako bi se izbegle post vakcinalne reakcije koje mogu uticati na takmičarske performanse (Kobluk i sar., 1995.).

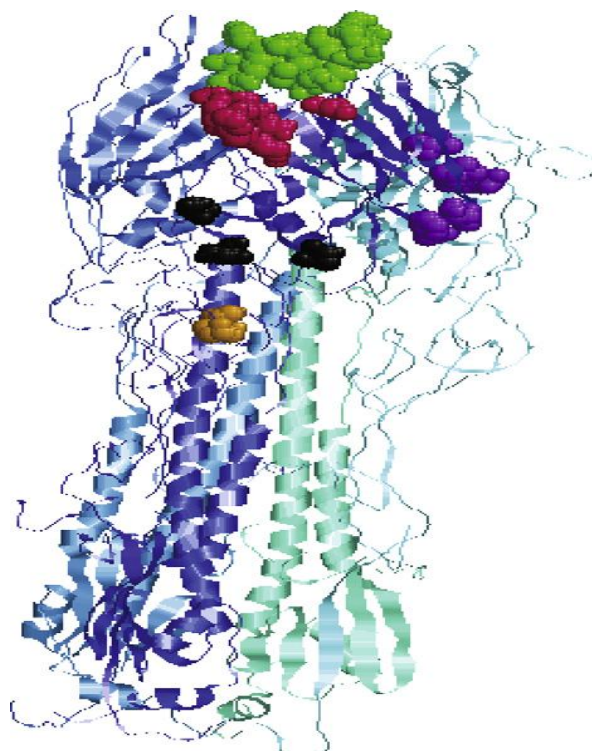
### ***2.7.1. Uticaj antigenskog drifta na efikasnost vakcinacije***

Antigenski drift predstavlja promenu amino kiselina u površinskim glukoproteina. Suptilno nasumično pojavljivanje mutacije menja strukturu proteina, tako da, tokom vremena, ona postaje sve neprepoznatljivija za antitela domaćina razvijena protiv ranijeg soja. Testovi koji se rutinski koriste za merenje nivoa antitela oslanjaju se na vezivanje antitela za antigen. Neka antitela razvijena protiv jednog virusa mogu se vezati za drugi virus na određenim lokacijama udaljenim od mesta za vezivanje receptora, ali ova kros-reaktivna antitela su mnogo manje efikasna u neutralizaciji virusa nego soj specifična antitela (Haaheim i Schild, 1980.). Ukoliko je životinja inficirana sa dva ili više virusa može doći do produkcije značajno genetski drugačijih novih virusa (slika 16), u ovom događaju ćelije su inficirane sa

dva ili više različita virusa, a razmena RNK segmenata između virusa dozvoljava da generacija progenih virusa sadrži novu kombinaciju gena, tako u teoriji nasumična inkorporacija RNK segmenata može dovesti do kreacije 254 nove genetske kombinacije od dva roditeljska virusa (Sellon i Long, 2013.). Ako se dovoljno promena desi na antigenskim mestima (koja se nalaze oko mesta za vezivanje receptora), virus može izbeći neutralizaciju (Daly i sar., 2011.) Promene aminokiselinskog sastava na antigenskim mestima na molekulu hemaglutinina (HA) znače da antitela koja su nastala u prethodnim infekcijama ili posle vakcinacije više nisu u stanju da neutrališu virus blokiranjem receptora (slika 17), HA struktura ljudskog virusa gripa H3N2 je vizualizovana koristeći RasMol gde tri HA monomera kombinuju se tako da formiraju špicast (tzv. spajk) glukoprotein koji se projektuje na površini virusa a amino kiseline na antigenskim mestima su označene kao bojene molekuli (lokacija A = pink, B = zelena, C = narandžasta, D = ljubičasta, E = crna). (Wilson i sar., 1981.). Generalno govoreći svinjama se pripisuje jedinstvena uloga kao vrsti kod koje dolazi do genetičkog preraspodele između različitih virusa influence (Kapoor i Dhama, 2014.).



**Slika 16. Šematski dijagram ilustruje genetičko reasortiranje (Sellon i Long, 2013.).**



**Slika 17. Trodimenzionalni prikaz influenza A virusa (Wilson i sar., 1981.).**

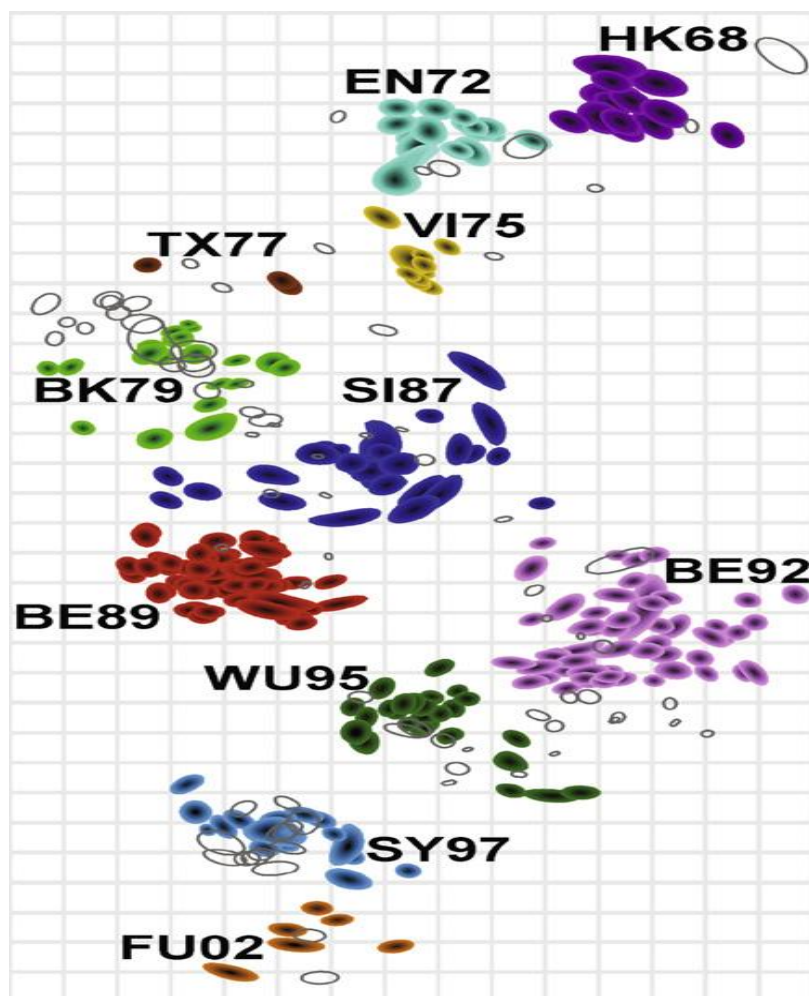
Vakcine protiv influence ljudi se preformulišu često (najčešće jednom godišnje), kako bi se osiguralo da su u njoj predstavljeni cirkulišući sojevi, a sa ciljem da se izbege neuspeh vakcine zbog antigenskog drifta. Značaj antigenskog drifta za efikasnost vakcine kod influence kopitara je takođe dokazana (Newton i sar., 1999., 2000.; Daly i sar., 2003., 2004.). Podaci iz oba polja posmatranja i studije odziva na vakcinaciju, posebno onih koji kvantitativno opisuju granične vrednosti nivoa antitela, korišćeni su za podešavanje parametre za matematičke modele (Glass i sar., 2002.; Park i sar., 2004.; Baguelin i sar., 2010.). Ovi modeli su pokazali kako male promene u sposobnost jedne vakcine da štiti protiv infekcije sa varijantnim sojem, posmatrano na individualnog nivoa u eksperimentima, mogu da imaju velike posledice na prenošenje influence kopitara kada se prenesu na populacioni nivo (Park i sar., 2004.).

Počevši od 1993. godine, primenjuje se globalni pristup nadzoru influence kopitara, a usvojen je i sistem izbora vakcinalnih sojeva. Stopa antigenskog drifta za virus influence kopitara odnosno sojeve H3N8 (Daly i sar., 1996.) je mnogo manja nego što je kod humanog virusa influence A (Fitch i sar., 1997.), s toga vakcinalni soj nije potrebno menjati tako često. Međunarodna organizacija za zaštitu zdravlja životinja (OIE) i Svetska zdravstvena

organizacija (WHO), odnosno njihovi paneli eksperata su 1995. godine preporučili da sojeve H3N8 vakcine treba dopuniti tako da uključuju i sojeve Suffolk/1989 ili Newmarket/2/93 koji predstavljaju Evroazijsku liniju i Newmarket/1/93 ili Kentucky/1994 za američku liniju (OIE, 1996.). Poslednje objavljenje promene ovih preporuka su napravljene 2004. godine, kada je preporučeno da se američka linija sojeva dopuni sa sojevima South Africa/4/03 ili Ohio/03 (OIE 2006).

Program nadzora sojeva virusa influence kopitara je modeliran na osnovu programa za humanu influencu, oslonac za ovaj program je analiza antigenskim razlika između sojeva korišćenjem mono-specifičnih ptičijih antiseruma (dobijenih iz krvi petlova) u testovima inhibicije hemaglutinacije (HI). Ovaj test se zasniva na sposobnosti virusa influence da aglutinira eritrocite i sposobnosti antiseruma životinja razvijenog protiv istog ili srodnih sojeva da blokira ovu aglutinaciju (Hirst, 1942). Test HI je obezbedio neophodne podatke za selekciju humanih sojeva virusa tokom preko 60 godina, ali kompleksne tabele podataka je teško protumačiti (Daly i sar., 2011.). Nedavno, (Smith i sar. 2004.) uspostavljen je metod opisan kao "antigenska kartografija". Antigenske mape stvorene od podataka dobijenih od testova HI pružaju jednostavnu vizuelnu interpretaciju podataka i povećavaju rezoluciju kojom virusi mogu da se razlikuju, jer se oni ne oslanjaju samo na parnu komparaciju. Antigenska kartografija je primenjena da bi se obezbedila detaljna retrospektivna analiza evolucije virusa humane influence H3N2 (slika 18), a sada se primenjuje i za analizu evolucije virusa influence kopitara.





*Slika 18. Antigena mapa virusa humane influenzae A (H3N2) sojeva od 1968. do 2003.*

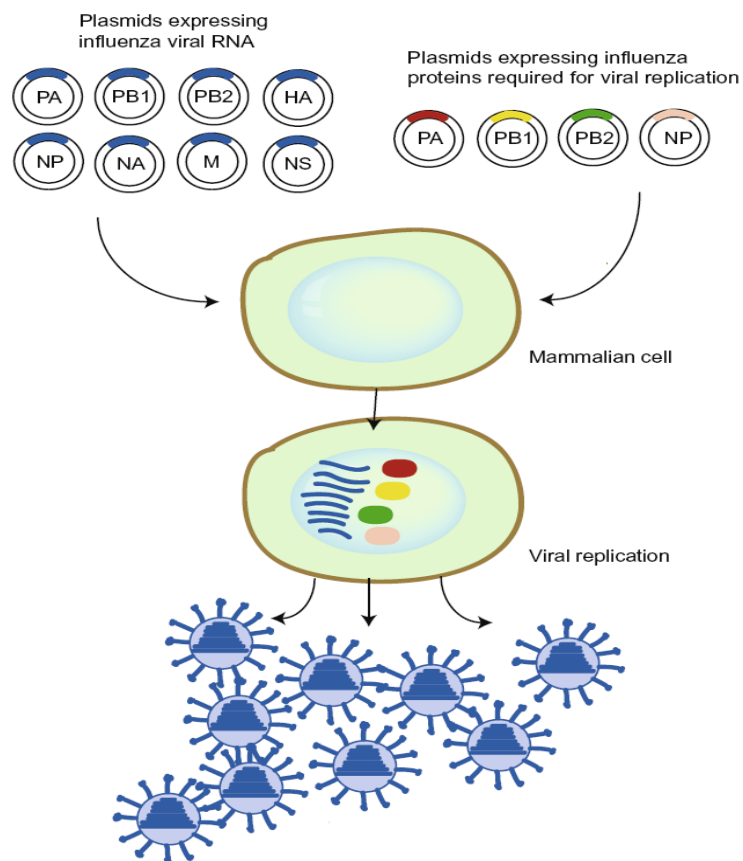
*(Smith i sar., 2004).*

Široko rasprostranjena epidemija influence kopitara koja se dogodila tokom 2003. godine osporila je pređašnje koncepcije o obimu antigenog drifta koji je potreban da bi izazvao manju zaštitu od infekcije. Tokom epidemije u Njmarketu, konji su bili inficirani uprkos nedavnoj vakcinaciji i visokom nivou serumskih antitela (Barquero i sar., 2007.), što bi značilo da je u pitanju veliki nesklad između vakcinalnog i epidemijskog soja. Međutim, ta tvrdnja se nije mogla u potpunosti potvrditi primenom aktuelnih antigenih kriterijuma u pogledu toga šta predstavlja značajnu neusklađenost antigena (Newton i sar., 2006.). Dodatne antigenske analize su bile usmerene na HA1 gen virusa iz izolata koji je rutinski sekvenciran radi procene stepena genetičke varijabilnosti na osnovu fenotipske razlike između sojeva. Kada se uporede HA1 sekvenca iz izolata iz epidemije 2003. godine sa vakcinalnim sojem Newmarket/1/93, dolazi se do podatka da je postojalo samo pet promena koje su se mogle

uočiti, a samo dve od njih su bili na antigenskom mestu, obe na mestu B, regionu varijabilnih aminokiselina blizu mesta za vezivanje receptora (Newton i sar., 2006.).

Načelo koje važi za humane sojeve glasi da je potrebno minimum 4 - 5 promena na najmanje dve antigenske lokacije kako bi moglo reći da se radi o značajnoj razlici (Wilson i Cox, 1990.). Međutim, nedavno je postalo jasno da je potrebno da se samo jedna ili dve aminokiseline zamene u molekulu HA humane influence, što može imati značajan uticaj na antigenost soja, u zavisnosti od toga gde se oni nalaze (Jin i sar., 2005.). Dalje matematičko modeliranje podataka iz vakcinacije i različitih studija o influenci kod konja dovelo je do efektivnog reproduktivnog broja, koji predstavlja broj novih slučajeva koje zaraženo grlo dalje inficira, u proseku, u populaciji sa mešovitom osetljivošću, kao što je populacija u kojoj nisu sva grla vakcinisana. Izbijanje zaraze će se potencijalno nastati ako efektivni reproduktivni broj počinje da prelazi 1.0, a matematički model predviđa da se ovo može desiti kada antigenski drift dovede do promene najmanje dve amino kiseline na antigenim mestima (Park i sar., 2009.).

Relativno nova laboratorijska tehnika se sve više koristi za istraživanje humanih virusa influence, a nazvana je plazmid zasnovana reverzna genetika (Neumann i sar., 1999.). Sistem obrnute genetika za virus influence kopitara je takođe razvijen (Quinlivan i sar., 2005.). U sistemu standardne obrnute genetike, svaki od osam segmenata gena virusa influence se klonira u plazmide pod kontrolom promotera, koji, kada se plazmid transferiše u odgovarajuću ćeliju, usmerava njihovu sintezu u RNK segmentima. Transferom svih osam plazmida u jednu ćeliju zajedno sa četiri plazmida može se izazvati ekspresija svakog od virusnih proteina potrebnih da se preuzme sistem za sintezu proteina ćelije i tako pokrene direktna sinteza virusnih proteina iz RNK segmenata, ćelija se na taj način može pretvoriti u fabriku za sintezu virusa (slika 19). Kako se svaki virusni segment prenosi preko posebnog plazmida, tako je relativno jednostavno da se zamene segmenti iz različitih virusnih sojeva ili da se koriste molekularne tehnike da bi se usmerenom mutagenezom uvele mutacije u željeni gen. Ova tehnika se može koristiti za bolje razumevanje mutacija koje verovatno imaju značajan uticaj na epidemiološki potencijal soja virusa u nastajanju, koji može pomoći u donošenju budućih odluke o promenama antigenog sastava vakcina.



**Slika 19.** Dijagram plazmid zasnovane reverzne genetičke tehnike, koja se može koristiti za sintezu viruse sa određenim mutacijama zaštićenog porekla (Daly i sar., 2011.).

### **3. CILJEVI I ZADACI RADA**

Na osnovu pregleda literature, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi mogućnosti korišćenja HI testa, Directigen testa i RT-PCR testa radi otkrivanja inficiranih životinja virusom influence
2. Utvrdi da li takve životinje ispoljavaju neke od kliničkih znakova, i da se na osnovu vakcinalnog statusa i kliničkih znakova uporede razlike između grupa životinja kao i razlike između testova za dijagnostiku influence kopitara
3. Utvrditi prisustvo virusa influence kao i antitela protiv virusa influence kod kopitara u odnosu na različite epizootiološke i kliničke manifestacije.

Na osnovu navedenih ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

1. Sprovesti epizootiološku anketu i klinički pregled konja i magaraca
2. Izvršiti serološka ispitivanja krvnih seruma konja i magaraca na prisustvo specifičnih antitela prema antigenima virusa influence
3. Utvrditi prisustvo virusa influence u uzorcima briseva konja i magaraca
4. Utvrditi prevalenciju influence kod konja i magaraca

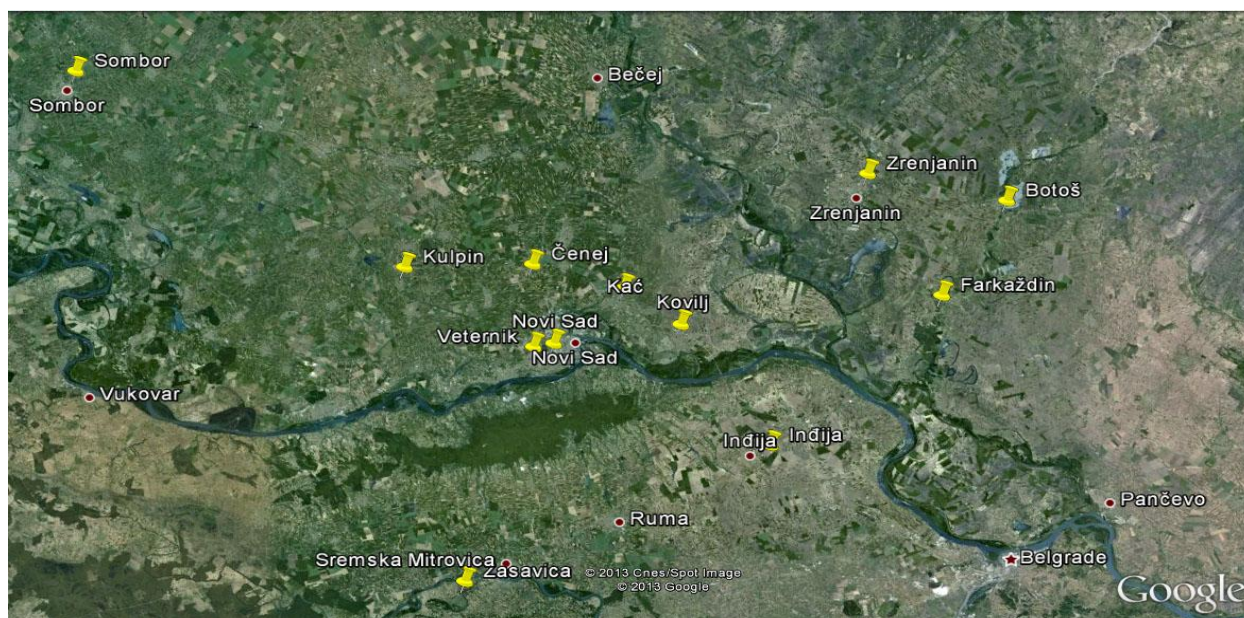
Postavljena je radna hipoteza da se očekuje da će biti otkrivene serološki pozitivne jedinke na influencu sa i/ili bez karakteristične kliničke slike, kao i biti dokazati prisustvo virusa kod više obolelih konja.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Materijal

#### 4.1.1. Osnovni podaci o geografskoj distribuciji i grupama kopitara uključenih u istraživanje

Istraživanje je vršeno na teritoriji AP Vojvodine, Republika Srbija. Geografska distribucija kopitara koji su uključeni u istraživanje je prikazana na karti 1.



*Karta 1.: Geografska distribucija životinja koje su uključene u istraživanje.*

Uzorkovanje bioloških materijala poreklom od kopitara je obavljeno u individualnim gazdinstvima, konjičkim klubovima, kao i u velikom zapatu magaraca (Specijalnom rezervatu prirode Zasavica). Istovremeno sa uzimanjem bioloških uzoraka, prikupljeni su osnovni epizootiološki podaci i bio je izvršen klinički pregled životinja.

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 61 grlo (51 konj i 10 magaraca). Sva grla su bila podeljena u dve grupe na osnovu vakcinalnog statusa.

Prvu grupu su činili redovno vakcinisani konji koji su prevashodno korišćeni u sportske svrhe. U ovoj grupi se nalazilo 10 konja. Konji iz ove grupe su dalje, posle kliničkog pregleda, podeljeni na dve podgrupe na one koje imaju neki od kliničkog simptoma koji su vezani za influencu i na one koje nemaju ove kliničke simptome. U podgrupi sa kliničkim simptomima je bilo 2 grla a u podgrupi bez kliničkih simptoma 8 grla.

Drugu grupu su činila grla koja nisu vakcinisana. U ovoj grupi se nalazio 41 konj i 10 magaraca. Grla su prethodno korišćena za različitu namenu (radne životinje, starija grla koja ne učestvuju u trkama i jedinke koje se koriste u rekreativne svrhe) različite starosti, rase, pola. Grla iz ove grupe su dalje, posle kliničkog pregleda, podeljeni na dve podgrupe na one koje imaju neki od kliničkog simptoma koji su vezani za influencu i na one koje nemaju ove kliničke simptome. U podgrupi sa kliničkim simptomima je bilo 11 grla a u podgrupi bez kliničkih simptoma 40 grla.

Kako su na osnovu kliničkih simptoma životinje dalje podeljene na podgrupe tako su dobijene četiri grupe: vakcinisane životinje sa kliničkim simptomima, vakcinisane životinje bez kliničkih simptoma, nevakcinisane životinje sa kliničkim simptomima i nevakcinisane životinje bez kliničkih simptoma. Raspored grupa je prikazan u tabeli 3.

***Tabela 3. Podela grla koja su učestvovala u istraživanju na grupe na osnovu vakcinalnog statusa i kliničkih simptoma koji se mogu povezati sa influencom.***

Podela grla po vakcinalnom statusu	Prema kliničkom nalazu
Vakcinisana grla	Sa kliničkim simptomima
	Bez kliničkih simptoma
Nevakcinisana grla	Sa kliničkim simptomima
	Bez kliničkih simptoma

#### **4.1.2. Uzorkovanje bioloških materijala poreklom od kopitara uključenih u istraživanje**

##### **4.1.2.1. Puna venska krv**

Uzimanje uzorka pune venske krvi za analizu kompletne krvne slike izvršeno je punkcijom *v. jugularis* u epruvete od 1,3 ml sa dodatim antikoagulansom etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA), uz primenu principa asepse i antiseipse. Odmah po uzorkovanju, epruvete su blago promućkane 6 puta zbog dejstva antikoagulansa. Uzorci su transportovani u laboratoriju u roku manjem od četiri sata.

##### **4.1.2.2. Krvni serum**

Istovremeno sa uzimanjem uzoraka pune venske krvi sa EDTA, uzeti su i uzorci pune venske krvi sa aktivatorom koagulacije radi izdvajanja krvnog seruma. Venepunkcija je izvršena na *v. jugularis*, uz primenu principa asepse i antiseipse, a krv je uzeta u vakutajnere od 10 ml u kojima je krv ostavljena da spontano koaguliše. Potom su uzorci krvi centrifugovani, na 3000 obrtaja tokom 10 minuta, radi izdvajanja krvnih seruma. Oni su potom odliveni u eppendorf epruvete od 1,5 ml, obeleženi i zamrznuti na  $-20^{\circ}$  C za izvođenje seroloških pretraga.

##### **4.1.2.3. Brisevi za RT-PCR i Direktigen test**

Brisevi iz nosa uzimani su uz pomoć plastičnog štapića sa pamučnom vatom iz kompleta za transport virusa, hlamidija, mikoplazmi i ureoplazmi proizvođača Copan. Od svake životinje uključene u istraživanje, uzeta su dva nazalna brisa iz obe nozdrve. Prvi nazalni bris sa transportnim medijumom je zamrznut radi izvođenja RT-PCR metode, a drugi

nazalni bris je korišćen za izvođenje brzog imunohromatografskog testa u cilju dokazivanja antigena virusa infuence kopitara.

#### ***4.1.2.4. Uzorci za patomorfološka, patohistološka i citološka ispitivanja***

Od 61 kopitara koji su bili uključeni u istraživanje, uzorci za citološka i patohistološka i patomorfološka ispitivanja su uzeta samo od tri jedinke koje su bile iz različitih etioloških razloga upućene na klanje.

Za citološku analizu uziman je bris iz traheje, pre mortem, duboko intra nazalno sterilnim plastičnim štapićem sa vatom na kraju.

Uzorci za patohistološka ispitivanja prikupljeni su post mortem i obuhvatili su deo traheje, kako iz kranijalnog dela tako i od bifurkacije, deo pluća – kranijalni i kaudalni rubovi levog i desnog plućnog krila.

## ***4.2. Metode***

### ***4.2.1. Epizootiološka anketa***

Pre kliničkog pregleda kopitara uključenih u istraživanje i uzimanja bioloških materijala poreklom od istih, prikupljeni su osnovni epizootiološki podaci i upisani u epizootiološku upitnik. Primer epizootiološkog upitnika koji se koristio u istraživanju je prikazan na slici 20.



**Anamneza - Influenca kopitara**

1. Redni broj: \_\_\_\_\_ Vlasnik \_\_\_\_\_ Mesto \_\_\_\_\_ Datum \_\_\_\_\_

2. Vrsta \_\_\_\_\_ Rasa \_\_\_\_\_ Ime \_\_\_\_\_ Pol: M Ž Starost \_\_\_\_\_

3. Poreklo: *Domaće* Uvoz – kada \_\_\_\_\_ odakle \_\_\_\_\_4. Namena: *Trkačka* *Izložbena* *Radna* *Bez posebne namene* *Ostalo*

Trke – koliko \_\_\_\_\_

5. Vakcinacija: *Da* *Ne*

Šema vakcinacije: \_\_\_\_\_

Kada je bila poslednja \_\_\_\_\_

6. Telesna kondicija: *Mršava* *Normalna* *Ugojena*T°: \_\_\_\_\_ *Hidratacija* *Normalna* *Dehidratacija*T° ekstremiteta: *Normalna* *Hladna* *Topla* Puls: *Normalan* *Povišen* *Smanjen*Sluznice: *Normalne* *Kongestija* *Cijanoza* *Iscedak* \_\_\_\_\_ *Drugo* \_\_\_\_\_7. Respiratorni sistem: Broj resp.: \_\_\_\_\_ Tip disanja: *Normalno* *Dyspnea* \_\_\_\_\_8. Kardiovaskularni: Broj otkucaja \_\_\_\_\_ Nalaz: *Normalan* *Drugo*: \_\_\_\_\_Ritam: *Regularan* *Iregularan*9. Pregled oka: *Normalan nalaz* *Mioza* *Midrijaza* *Konjunktivitis* - *Jedno* *Oba***10. Klinička slika u ranijem periodu:**Povišena temperatura *Da* *Ne*Kašalj *Da* *Ne*Otežano disanje *Da* *Ne*Konjunktivitis *Da* *Ne*

Drugi simptomi \_\_\_\_\_

**11. Podaci o kretanju u skorije vreme:***Trke* *Izložbe* *Sajmovi**Gde, koje i kada:* \_\_\_\_\_

Broj grla u staji \_\_\_\_\_

Grla se drže: *Zajedno* *Odvojeno* *Slobodno u ispustu*Kontakt sa pticama *Da* *Ne***Slika 20. Epizootiološka anketa****4.2.2. Klinički pregled**

Posle popunjavanja epizootiološkog upitnika, sva grla su bila klinički pregledana. Klinički pregled je podrazumevao opšti i specijalni klinički pregled. Korišćene su metode

adspekcije, palpacije, perkusije i auskultacije. Prilikom pregleda je svim grlima rektalno merena telesna temperatura.

#### ***4.2.3. Analiza kompletne krvne slike***

Radi određivanja kompletne krvne slike, korišćena je metoda fotometrije (hematološki analajzer Idexx model VetAutoread). Za sve uzorke pune venske krvi sa EDTA kopitara uključenih u ovo istraživanje utvrđeni su sledeći parametri kompletne krvne slike: hematokrit, hematoglobin, srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu, broj leukocita, broj granulocita, procenat granulocita, broj limfocita/monocita, procenat limfocita/monocita i broj trombocita.

#### ***4.2.4. Test inhibicije hemaglutinacije***

Kao referentni virus za HI odnosno RIHA test za suptip H7N7 korišćen je virus influence A/Equine/1/Prague/56 a za suptip H3N8 virus influence A/Equine/Miami/1/63. Test je urađen na mikrotitar pločama sa U izgledom bazenčića. Ispitivani krvni serumi su prošli predtretman radi uklanjanja nespecifičnih hemaglutinina, a zatim su inaktivisani na temperaturi od 56° C tokom 30 minuta. Predtretman je obuhvatao upotrebu kaolina i eritrocita za adsorpciju. Tretirani krvni serumi su razblaženi u PBS-u, i dodata je standardna doza antigena (HA titar od 1/4 po bunaru za mikrotitraciju testa). Potom je izvršeno inkubisanje na sobnoj temperaturi (23° C ± 2° C) tokom 30 minuta. Nakon nežnog mešanja, dodati su eritrociti. Rezultati testa su očitani nakon 30 minuta. Titar HI je očitao kao najviše razređenje krvnog seruma koje daje potpunu inhibiciju aglutinacije. U ovom testu su korišćeni eritrociti zamorca. Neaglutinirani eritrociti zamorca se pojavljuju kao "dugme" na dnu bunara što može da potraje duže vreme. Titar HI je recipročna vrednost najvećeg razređenja koje pokazuje potpunu inhibiciju aglutinacije. Četvorostruko ili veće povećanje titra između uparenih serumu ukazuje na nedavnu infekciju. S druge strane kao granična

vrednost pozitivnog HI testa može se uzeti vrednost titra  $\geq 10$ , odnosno za takve životinje se smatra da su bile u dodiru sa virusom u ranijem periodu (Meijer i sar., 2006.).

#### Titracija hemaglutinacije

- Dodato je 25  $\mu$ l PBS u sve bunare u redu mikrotitar ploče.
- Dodato je 25  $\mu$ l virusa u prvi bunar zatim je generisana serija dvostrukih razređenja preko ploče i ostavljen poslednji bunar kao negativna kontrola.
- Dodato je zatim dodatnih 25  $\mu$ l PBS svim bunarima.
- Dodato je 50  $\mu$ l RBC svim bunarima. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi. Titar je uzet kao poslednje razređenje virusa koje daje delimičnu HA.

#### Postupak ispitivanja

- Sipano je 25  $\mu$ l PBS-a u sve bunare mikrotitar ploče.
- Dodato je 25  $\mu$ l seruma u prvi bunar u redu od 12, a zatim generisana dvostruka serijska razređenja, a poslednja je ostavljena kao kontrolu.
- Antigen je razređen da se dobije doza od 4 HA jedinice ( $4 \times$  minimalna aglutinirajuća doza, odnosno titar/4).
- Dodato je 25  $\mu$ l svakom bunaru, i inkubirano na sobnoj temperaturi ( $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ) tokom 30 minuta.
- Dodato je 50  $\mu$ l RBC svakom bunaru. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta.
- Ploče su pročitane nagnjanjem do 70 stepeni, tako da ne-aglutinirane ćelije odu na dno bunara. Izostanak aglutinacije je beležen kao pozitivan rezultat.

#### ***4.2.5. BD Directigen EZ Flu A+B, brzi test za direktnu detekciju i diferencijaciju A i B viralnih antigena influenzae***

Svi nazalni brisevi kopitara uključenih u ovo istraživanje su bili pregledani primenom navedenog imunohromatografskog (ELISA) testa. Uzorci nazalnih briseva kopitara su bili dobro izmešani pre obrade, bez centrifugiranja.

Izvođenje BD Directigen EZ Flu A+B testa je izvršeno u nekoliko koraka:

1. Directigen EZ Flu A+B test pločice su izvađene iz svoje folije neposredno pre testiranja i tom prilikom su označene test pločice i epruvete.
2. Posle laganog mešanja 4 kapi Reagensa E ukapavana su u DispensTube epruvetu.
3. Potom je u DispensTube epruvetu sa reagensom E dodato 300  $\mu$ L uzorka nazalnog brisa kopitara.
4. Posle toga DispensTube epruveta se zatvara sa odgovarajućim DispensTube vrhom.
5. Tako pripremljen uzorak je zatim dobro izmešan.
6. Potom se DispensTube epruveta okrene naopako i drži se za kraj koji je dalji od vrha uz lagani pritisak iscede tri (3) kapi obrađenog uzorka u odgovarajuću test pločicu odnosno po tri (3) kapi u svaki bunarčića za influencu A i B.
7. Takve test pločice su ostavljane na sobnoj temperaturi a rezultati su čitani nakon 15 minuta.

#### **Tumačenje rezultata**

Intenzitet kontrolne linije može da varira između prozora za čitanje influenzae A i B. Variranje u intenzitetu kontrolne linije je takođe prihvatljivo. Pozadina bi trebalo da bude bela do svetlo roze i može da varira u intenzitetu između prozora za čitanje influenzae A i B.

**Pozitivan test za influencu tip A (influenca A antigen prisutan)** - crvenkasto purpurna linija se pojavljuje na položaju test "T" i kontrolnom "C" položaju u Directigen EZ influenzae prozoru za čitanje. Ovaj rezultat ne identifikuje ni jedan poseban podtip virusa influenzae. Crvenkasto purpurna linija takođe treba da se pojavi na "C" kontrolnom položaju u Directigen EZ influenzae prozoru za čitanje. To ukazuje da je antigen influenzae detektovan u uzorku. Pozadina bi trebalo da bude bela do svetlo roze.

**Pozitivan test za influencu tip B (influenca B antigen prisutan)** - crvenkasto purpurna linija se pojavljuje na testu u "T" položaju i kontroli na "C" položaju u Directigen EZ influenza prozora za čitanje. Crvenkasto purpurna linija takođe treba da se pojavi na "C" prozoru za kontrolu. To ukazuje da influenza tip B antigen je detektovan u uzorku. Pozadina bi trebalo da bude bela do svetlo roze.

**Negativan test na influencu tipa A ili B (nije otkriven antigen)** - Nema crvenkasto purpurne linije vidljive na testu u "T" položaju bilo za influencu A ili B u prozoru za čitanje što znači da influenza A antigen ili/i B antigen, nisu otkriveni u uzorku. Crvenkasto purpurna linija na kontrolnom "C" položaju u prozoru za čitanje ukazuje na pravilno izvođenje postupka ispitivanja i ispravnost reagenasa. Pozadina bi trebalo da bude bela do svetlo roze.

**Nevažeći test** - Test je nevažeći ili za influencu tipa A, ili za influencu tipa B, ili za oba tipa, ako ne postoji crvenkasto ljubičasta linija vidljiva pored kontrolnog "C" položaja u odgovarajućem prozoru za čitanje. Test je takođe nevažeći ukoliko se pojavljuje crvenkasto purpurna linija na testu u "T" položaju kod oba prozora za čitanje prozora za isti uzorak. Ako je neispravan, test mora biti ponovljen.

#### ***4.2.6. Ekstrakcija RNK iz nazalnih briseva i dokazivanje genoma virusa influence primenom RT-PCR testa***

Ekstrakcija RNA (postupak sa Isolate RNA kit –BIOLINE) iz nazalnih briseva kopitara je urađena po sledećem protokolu:

1. Za svaki uzorak spremljena je PCR čista eppendorf epruveta (1,5ml) obeležena brojem uzorka. Pri svakom postavljanju postavljana je bar jedna negativna kontrola (ultra čista voda) i jedna pozitivna kontrola (suspenciju virusa koji se utvrđuje RT-PCR-om);
2. U svaku eppendorficu dodato je 600µl Lysis Buffer R koristećenjem jednog nastavka sa filterom;

3. Zatim, dodato je po 150 $\mu$ l svakog uzorka po unapred određenom redosledu + negativna kontrola i pozitivna kontrola (tačka 1), korišćeni su zasebni nastavci sa filterom i pažljivo promešani pipetiranjem;
4. Inkubacija je bila na sobnoj temperaturi 10 minuta;
5. Prebačena je mešavina (750 $\mu$ l) u Spin kolone R1 predhodno postavljene u kolekting tube korišćenjem zasebnih nastavaka sa filterom;
6. Centrifugirano je na 10.000 x g 2 minuta. Odbačena je spin kolona a sačuvan filtrat u kolekting tubi;
7. Na filtrat je dodat u srazmeri 1:1 (u istoj količini 750 $\mu$ l) 70% etanola i promešano kratko;
8. Prebačeno 750 $\mu$ l rastvora u Spin kolone R2 koje su predhodno stavljene u kolekting tube i centrifugirane na 10.000 x g 2 minuta. Odbačene su zatim kolekting tube sa sadržajem, a spin kolone prebačene u nove kolekting tube;
9. Prebačeno je zatim preostalih 750 $\mu$ l rastvora u Spin kolone R2 iz tačke 8 i centrifugirane na 10.000 x g 2 minuta. Odbače su zatim kolekting tube sa sadržajem, a spin kolone prebačene u nove kolekting tube;
10. Dodato je zatim 500 $\mu$ l Wash Buffer AR i centrifugirano na 10.000 x g 1 minut. Odbačene su zatim kolekting tube sa sadržajem, a spin kolone prebačene u nove kolekting tube;
11. Zatim je dodato 700 $\mu$ l Wash Buffer BR i centrifugirano na 10.000 x g 1 minut. Izbačen je sadržaj iz kolekting tuba, a spin kolone vraćene u iste kolekting tube;
12. Centrifugirano je zatim na 10.000 x g 2 minuta. Odbačene kolekting tube sa sadržajem, a spin kolone prebačene u predhodno obeležene eppendorfice od 1,5 ml;
13. Dodato je 50 $\mu$ l RNaze čiste vode i inkubirano oko 1 minut, a zatim centrifugirano 6000 x g 1 minut.
14. Odbačene su spin kolone, a resuspendovani RNA uzorci su korišćeni odmah u RT-PCR.

Za detekciju RNK genoma virusa influence u uzorcima nazalnih briseva konja korišćen je *in house* metod baziran na metodologiji *TagMan* jednostepene reakcije reverzne transkripcije – lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*TagMan* one step reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR) kojom je umnožavan deo gena koji kodira sintezu matriks proteina svih influenza A virusa, čime je omogućena detekcija svih influenza A virusa bez obzira na vrstu domaćina (influenca A virusi ptica, konja, svinja, ljudi). Virusna RNK je izolovana (estrahovana) upotrebom komercijalnog kita ISOLATE II RNA Mini Kit

(“Bioline”, Holandija) po uputstvu proizvođača. Reakcija one-step RT-qPCR je izvedena korišćenjem komercijalnog kita RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR System (Life Technologies Corporation) sa oligonukleotidnim prajmerima (forward prajmerom za M gen: SpaMgen F: 5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG -3' i reverznim prajmerom za M gen: SpaMgen R: 5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3') i oligonukleotidnom probom (proba za M gen: SpaMgen P: 5'-6- FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA -3') koji umnožavaju i detektuju deo gena matriks proteina svih influenza A virusa, opisanih od strane Spackman i sar. (2002.). Svaka reakcija se sastojala od 15 µl reakcionog miksa koji je sadržavao 1 x RNA UltraSense reakcionog miksa, 20 µM oba prajmera, 10 µM oligonukleotidne probe, 1 x ROX referentne boje i 1 µl of RNA UltraSense enzimskog miksa. Na ovu mešavinu je dodavana estrahovana RNK ispitujućeg ili kontrolnog uzorka u količini od 5 µl, što je činilo konačnu zapreminu reakcijske mešavine od 20 µl. Temperaturni ciklus reakcije je bio sledeći: reverzna transkripcija 15 min na 50° C, zatim 2 min na 95° C za DNK denaturaciju i inaktivaciju enzima reverzne transkriptaze, koja je praćena sa 50 uzastopnih ciklusa denaturacije od 15 s na 95° C i vezivanja prajmera i proba sa izduživanjem nastalih lanaca DNK od 50 s na 60° C. Reakcije *TagMan* RT-qPCR su izvedene upotrebom 7500 Real Time RT-PCR System instrumenta (Applied Biotechnology). Kontrola kvaliteta je pratila svaku reakciju. Kao pozitivne kontrole su u svakoj reakciji korišćeni RNA virusa influence H3N8 soja Miami (A/equine/Miami/1/1963(H3N8) i H7N7 soja Prag (A/Equine/Prague/1/1956 H7N7) (NVSL, USA), a kao negativna kontrole je služila RNK/DNK čista voda.

**Tabela 4. Protokol Real-time RT-PCR (Spackman i sar., 2002.).**

Eksperiment	TaqMan <sup>®</sup> Influenca A, M gen			
	Stock volume	H2O	Final volume	Molarity
Primer forward: SpaMgen F	20 µl	80 µl	100 µl	20 µM
Primer reverse: SpaMgen R	20 µl	80 µl	100 µl	20 µM
Proba: SpaMgen P	10 µl	90 µl	100 µl	10 µM

**Tabela 5. Program TaqMan<sup>®</sup> Influenca A, M gen**

Etape	1	2	3	4
Temperatura	50 <sup>0</sup> C	95 <sup>0</sup> C	95 <sup>0</sup> C	60 <sup>0</sup> C
Vreme	15:00	2:00	0:15	0:50
Broj ciklusa	1	1	50 x	50 x

#### **4.2.7. Patomorfološka, patohistološka i citološka ispitivanja**

**Patomorfološka metoda.** Na liniji klanja nakon evisceracije organa uzorkovani organi su pregledani primenom adspekcije, palpacije a zatim su zasečeni uzdušnim rezom radi utvrđivanja izgleda na poprečnom preseku organa.

**Patohistološka metoda.** Uzorci tkiva su fiksirani u 10% neutralnom formalinu i obrađeni rutinski, ukalupljeni u parafin, isečeni na 5 µm, i obojeni hematoksilin-eozinom. Bojenje hematoksilinom-eozinom je započeto rastvaranjem parafina u dva kupatila ksilola po 15 min. Zatim je ksilol rastvaran u kupatilu 100% alkohola 5 min a onda i u 96% alkoholu 5 min. Preparati su zatim dobro isprani destilovanom vodom. Potom je preparat potapan u hematoksilin 5 min i odmah zatim ispran tekućom vodovodnom vodom 20 min. Zatim je preparat bojen eozinom. Bojenje je izvršeno potapanjem preparata u eozin 1 min i ispiranjem u 100% alkoholu.

Svi citološki i patohistološki preparati analizirani pod svetlosnim mikroskopom na malom, srednjem i velikom uveličanju (10X, 40X i 100X).

**Citološka metoda.** Napravljen je otisak na mikroskopsko staklo koji je zatim bojen po Gimzi. Bojenje po Gimzi izvedeno je fiksacijom pomoću 100% metil alkohola, uranjanjem preparata u trajanju od 30 sekundi. Razmaz je postavljen na stalak za bojenje u vodoravni položaj i preliven rastvorom boje, koje je napravljen neposredno pre upotrebe, 1 kap Gimza boje na 1 ml fosfatnog pufera. Za jedan razmaz korišćeno je 3 ml rastvora boje.



Bojenje je trajalo 30 min a zatim je preparat ispran kratko destilovanom vodom i ostavljen da se osuši.

#### ***4.2.8 Statistička obrada podataka***

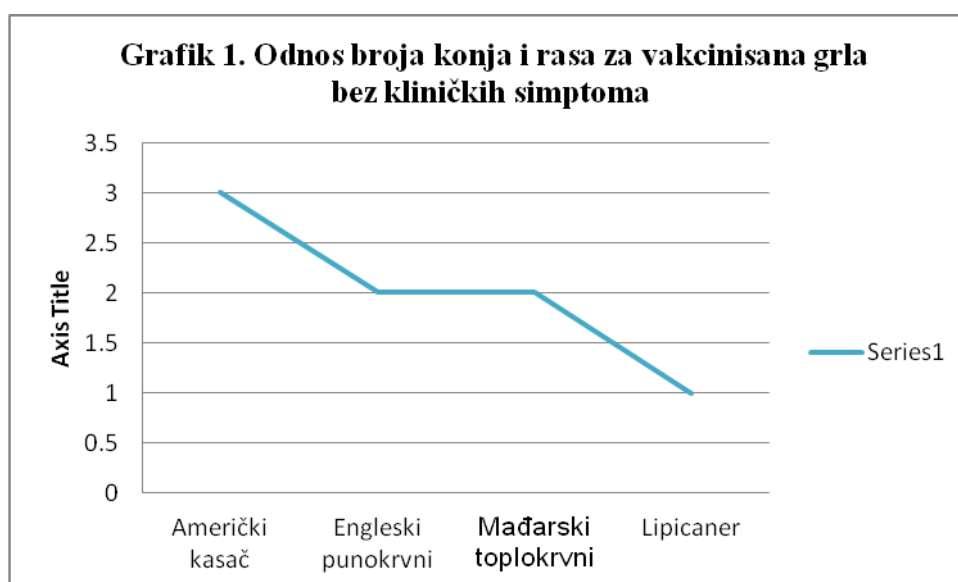
Rezultati su bili obrađeni primenom epidemiološkog kalkulatora "Open epi" uz pomoć koga je izračunat odds ratio.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Epizootiološki podaci

#### 5.1.1. Epizootiološki podaci vezani za vakcinisana grla bez kliničkih simptoma

U ovoj grupi nalazilo se 8 sportskih grla koja su vakcinisana protiv influence primenom vakcine Equilis Resequin (Intervet). Sva grla su zadnji put bila vakcinisana godinu dana pre istraživanja, odnosno pre prethodne sportske sezone. Podaci o rasama i starosti su prikazani na grafiku 1 i u tabeli 6. Ovu grupu su činile životinje starosti od 7 do 22 godine, rasa američki kasač, engleski punokrvnjak, mađarski toplokrvni i lipicaner.



**Grafik 1. Odnos broja konja i rasa vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma.**

**Tabela 6. Podaci od starosti vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma.**

<b>Godine starosti</b>	<b>Broj jedinki</b>
7	1
8	1
10	2
12	1
15	1
17	1
22	1

### **5.1.2. Epizootiološki podaci vezani za vakcinisana grla sa kliničkim simptomima**

U ovoj grupi nalazilo se 2 grla koja su redovno vakcinisana protiv influence jer se radilo o sportskim konjima. Oba grla su zadnji put bila vakcinisana godinu dana pre istraživanja, odnosno pre prethodne sportske sezone. Posle kliničkog pregleda ustanovljeno je da grla iz ove grupe imaju neki od kliničkih simptoma koji se mogu povezati sa influencom i to pre svega serozni iscedak iz nosa. Podaci o rasama i starosti su prikazani u tabeli 7.

**Tabela 7. Podaci od starosti vakcinisanih grla sa kliničkim simptomima.**

<b>Rasa</b>	<b>Godine starosti</b>
Američki kasač	20
Američki kasač	26

### 5.1.3. Epizootiološki podaci vezani za nevakcinisana grla bez kliničkim simptoma

U ovog grupi nalazilo se 40 grla. Sva grla iz ove grupu su bila nevakcinisana. Kako se nije radilo o grlima koja su učestvovala u sporskim takmičenjima po važećim nacionalnim propisima nisu ni bila u obavezi da budu vakcinisana. Od ukupnog broja konja devet grla je redovno tokom perioda vegetacije držano na ispaši gde su bila u kontaktu sa velikim brojem drugih životinja, kako kopitara tako i ptica, svinja i goveda. U ovo grupu je uvršteno i 7 magaraca koji su držani u različitim uslovima tj. u individualnom držanju od 1-2 životinje (3 grla) i u grupnom držanju od 120 životinja (4 grla). Posle kliničkog pregleda ustanovljeno je da grla iz ove grupe nemaju kliničkih simptoma koji se mogu povezati sa influencom. Sve životinje su u bile kontaktu sa pticama jer se drže u otvorenim ili poluotvorenim objektima. Podaci o rasama i starosti su prikazani na grafiku 2 i u tabeli 8.



**Grafik 2. Odnos broja grla i rasa nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma**

**Tabela 8. Podaci od starosti nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma.**

<b>Godine starosti</b>	<b>Broj životinja</b>
5 meseci	1
8 meseci	2
1	1
1,5	2
2,5	1
2	1
3	2
4	4
5	6
6	4
8	1
9	2
10	4
11	3
15	2
17	1
19	1
22	1

#### ***5.1.4. Epizootiološki podaci vezani za nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima***

U ovog grupi nalazilo se 11 grla. Sva grla iz ove grupu su bila nevakcinisana. Kako se nije radilo o grlima koja su učestvovala u sporskim takmičenjima po važećim nacionalnim propisima nisu ni bila u obavezi da budu vakcinisana. Od ukupnog broja konja devet grla je redovno tokom perioda vegetacije držano na ispaši gde su bila u kontaktu sa velikim brojem drugih životinja, kako kopitara tako i ptica, svinja i goveda. U ovo grupu je uvršteno i 3 magarca koji su držani u različitim uslovima tj. u individualnom držanju od 1-2 životinje (1

grlo) i u grupnom držanju od 120 životinja (2 grla). Posle kliničkog pregleda ustanovljeno je da grla iz ove grupe imaju neki od kliničkih simptoma koji se mogu povezati sa influencom. Sve životinje su u bile kontaktu sa pticama jer se drže u otvorenim ili poluotvorenim objektima. Podaci o rasama i starosti su prikazani na grafiku 3 i u tabeli 9.



**Grafik 3. Odnos broja grla i rasa nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima**

**Tabela 9. Epizootiološki podaci od starosti nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima.**

Godine starosti	Broj životinja
10 meseci	2
11 meseci	1
4	3
5	2
6	1
7	1

## **5.2. Rezultati kliničkog pregleda**

### **5.2.1. Klinički pregled vakcinisanih grla**

Kliničke simptome u grupi vakcinisanih životinja, koju je činilo 10 grla, prilikom prvog pregleda, a koji su ukazivali na influencu pokazalo je 2 grla (20%) i to blagi serozan iscedak. Prilikom drugog pregleda ovi simptomi su ili nestali ili su bili manje izraženi. Rezultati su prikazani u tabeli 9. i odnose se samo životinje koje su ispoljile neki od kliničkih simptoma koji su navedeni u tabeli.

**Tabela 9. Rezultati kliničkog pregleda vakcinisanih grla.**

<b>Grlo</b>	<b>Klinički simptom</b>
Konj 14	Serozni iscedak
Konj 15	Serozni iscedak
Ukupno	2
%	20

### **5.2.2. Klinički pregled nevakcinisanih grla**

Kliničke simptome u grupi nevakcinisanih grla, prilikom prvog pregleda, koji su ukazivali na influencu pokazalo je 11 grla (21,57%) i to blagi serozan iscedak iz nosa odnosno mukopurulentan iscedak, krepitacije, kašalj, konjuktivitis i uvećanje submandibularnih limfnih čvorova. Prilikom drugog pregleda ovi simptomi su ili nestali ili su bili manje izraženi. Klinički simptomi su uočeni kod tri magarca i osam konja. Rezultati su prikazani u tabeli 10. i odnose se samo životinje koje su ispoljile neki od kliničkih simptoma koji su navedeni u tabeli.

**Tabela 10. Rezultati kliničkog pregleda nevakcinisanih grla.**

Grlo/Klinički simptom	Serozni iscedak	Mukopurulentni iscedak	Krepitecije	Kašalj	Konjuktivitis	Uvećanje submandibularnih limfnih čvorova
Konj 1	+	-	-	+	-	-
Magarac 5	+	-	+	-	-	-
Konj 9	+	-	-	-	-	-
Konj 19	-	-	-	+	-	-
Konj 20	-	-	-	+	-	-
Konj 32	-	-	-	+	-	-
Konj 35	+	-	-	-	-	-
Konj 40	-	+	+	+	-	+
Magarac 51	-	-	-	-	+	-
Magarac 53	-	-	-	-	+	-
Konj 59	+	-	-	-	-	-
Ukupno	5	1	2	5	2	1
%	9,8	1,96	3,92	9,8	3,92	1,96

### **5.3. Rezultati kompletne krvne slike**

#### **5.3.1. Rezultati kompletne krvne slike kod vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma**

Od ukupnog broja konja iz grupe vakcinisanih životinja bez kliničke slike, kod 4 grla (50%), zabeleženi su parametri kompletne krvne slike koji su van referentnih vrednosti. Kod ovih životinja registrovana je anemija, leukopenija i limfopenija. Kod svih grla dokazano je odstupanje više od jednog hematološkog parametra.

Rezultati pregleda kompletne krvne slike, za životinje kod kojih su registrovana odstupanja, su prikazani u tabeli 11.



**Tabela 11. Rezultati kompletne krvne slike kod vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma. Strelica na dole (↓) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar bio niži od fiziološke vrednosti za dati parametar. Strelica na gore (↑) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar bi viši od fiziološke vrednosti za dati parametar. Prikazani su rezultati samo za ona grla iz ove grupe koja su imala barem jedan parametar kompletne krvne slike van fizioloških parametara.**

Grlo / Parametar	Hematokrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	Srednja koncentracija hemoglobina (g/dL)	Broj leukocita ( $\times 10^9/L$ )	Broj granulocita ( $\times 10^9/L$ )	Procenat granulocita (%)	Broj limfocita/monocita ( $\times 10^9/L$ )	Procenat limfocita/monocita (%)	Broj trombocita ( $\times 10^9/L$ )
Konj 11	42,2	15,5	36,7	5,9 ↓	3,9	66	2,0 ↓	34	188
Konj 54	33,0	12,1	36,7	4,4 ↓	3,0	68	1,4 ↓	32	146
Konj 55	33,9	12,4	36,6	5,5 ↓	3,5	62	2,0 ↓	38	156
Konj 58	30,1 ↓	11,0	36,5	6,6	4,6	70	2,0 ↓	30	164
Ukupno grla	1	-	-	3	-	-	4	-	-
%	12,5	-	-	37,5	-	-	50	-	-

### ***5.3.2. Rezultati kompletne krvne slike kod vakcinisanih grla sa kliničkim simptomima***

U ovoj grupi sve životinje su imale fiziološki nalaz kompletne krvne slike.

### ***5.3.3. Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma***

Od ukupnog broja konja, magaraca i ponija iz ove grupe 16 grla (40%) je na nalaz kompletne krvne slike pokazalo neke od parametara koji su van referentnih vrednosti, odnosno nalaz kompletne krvne slike je pokazao postojanje anemije, leukopenije, leukocitoze, granulocitoze, limfopenije, limfocitoze i trombocitoze. Ukupno 11 grla je pokazalo odstupanje više od jedne reference.

Rezultati pregleda kompletne krvne slike, za životinje kod kojih su registrovana odstupanja, su prikazani u tabeli 12.

**Tabela 12. Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma. Strelica na dole (↓) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar niži od fiziološke vrednosti za dati parametar. Strelica na gore (↑) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar bi viši od fiziološke vrednosti za dati parametar. Prikazani su rezultati samo za ona grla iz ove grupe koja su imala barem jedan parametar kompletne krvne slike van fizioloških parametara.**

Grlo/ Parametar	Hematokrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	Srednja koncentracija hemoglobina (g/dL)	Broj leukocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Broj granulocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Procenat granulocita (%)	Broj limfocita/ monocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Procenat limfocita/ monocita (%)	Broj trombocita (x10 <sup>9</sup> /L)
Konj 8	35,5	13,0	36,6	5,4 ↓	3,5	65	1,9 ↓	35	206
Konj 17	29,1 ↓	9,9 ↓	34,0	7,6	5,6	74	2,0 ↓	26	246
Konj 23	41,8	15,3	36,6	13,0 ↑	7,0	54	6,0	46	280
Konj 24	36,4	12,7	34,9	12,7 ↑	12,0 ↑	94	0,7 ↓	6	299
Konj 25	43,0	15,4	35,8	11,4	10,7 ↑	94	0,7 ↓	6	268
Konj 33	36,8	13,3	36,1	5,5 ↓	3,6	65	1,9 ↓	35	177
Konj 37	36,2	13,2	36,5	7,9	5,9	75	2,0 ↓	25	242
Konj 41	37,6	13,8	36,7	7,0	5,3	76	1,7 ↓	24	195
Konj 42	37,4	13,9	36,2	15,7 ↑	8,2 ↑	52	7,7 ↑	48	315
Konj 43	42,0	15,2	36,2	13,0 ↑	5,3	41	7,7 ↑	59	312
Konj 46	33,6	12,0	35,7	5,9 ↓	4,2	71	2,0 ↓	29	231
Mag. 48	33,1	12,1	36,6	13,3 ↑	8,4 ↑	63	4,9	37	295

*Mihajlo Erdeljan**Doktorska disertacija**Rezultati*

Mag. 49	38,1	14,0	36,7	17,3 ↑	8,1 ↑	47	9,2 ↑	53	398 ↑
Mag. 50	32,4	11,9	36,7	18,3 ↑	9,1 ↑	50	9,2 ↑	50	398 ↑
Mag. 52	32,5	11,9	36,6	13,3 ↑	6,6	50	6,7	50	338
Konj 61	37,6	13,8	36,7	11,7	9,1 ↑	78	2,6	22	206
Ukupno	1	1	-	10	6	-	11	-	2
%	2,5	2,5	-	25	15	-	27,5	-	5

---

#### ***5.3.4. Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima***

Od ukupnog broja konja, magaraca i ponija iz druge grupe 6 grla (54,55%) je na nalazu kompletne krvne slike pokazalo neke od parametara koji su van referentnih vrednosti, odnosno nalaz kompletne krvne slike je pokazao postojanje anemije, limfopenije, leukopenije, leukocitoze, limfopenije, limfocitoze i trombocitoze. Sva grla su pokazala odstupanje više od jedne reference.

Rezultati pregleda kompletne krvne slike, za životinje kod kojih su registrovana odstupanja, su prikazani u tabeli 13.

**Tabela 13. Rezultati kompletne krvne slike kod nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima. Strelica na dole (↓) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar niži od fiziološke vrednosti za dati parametar. Strelica na gore (↑) posle izmerene vrednosti označava da je izmereni parametar bi viši od fiziološke vrednosti za dati parametar. Prikazani su rezultati samo za ona grla iz ove grupe koja su imala barem jedan parametar kompletne krvne slike van fizioloških parametara.**

Grlo/ Parametar	Hematokrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	Srednja koncentracija hemoglobina (g/dL)	Broj leukocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Broj granulocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Procenat granulocita (%)	Broj limfocita/ monocita (x10 <sup>9</sup> /L)	Procenat limfocita/ monocita (%)	Broj trombocita (x10 <sup>9</sup> /L)
Konj 1	39,5	14,5	36,7	5,9 ↓	6,2	4,7	1,5 ↓	24	149
Konj 19	47,7	16,5	34,6	14,4 ↑	6,3	44	8,1 ↑	56	385 ↑
Konj 20	41,8	14,1	33,7	12,3	11,6 ↑	94	0,7 ↓	6	415 ↑
Konj 40	38,4	13,9	36,2	15,8 ↑	8,2 ↑	52	7,6 ↑	48	325
Mag. 51	27,3 ↓	10,0 ↓	36,6	9,9	5,0	51	4,9	49	305
Konj 59	30,7 ↓	11,3	36,8	10,9	8,1 ↑	74	2,8	26	133
Ukupno	2	1	-	3	3	-	4	-	2
%	18,18	9,09	-	27,27	27,27	-	36,36	-	18,18

## ***5.4. Test inhibicije hemaglutinacije***

### ***5.4.1. Rezultati HI testa kod vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma***

Testom inhibicije hemaglutinacije je kod 2 konja iz ove grupe (25%), utvrđeno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Sve životinje su bile negativne na povećanje titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10, rezultati ukazuju da su sve životinje bile u kontaktu sa virusom, odnosno da su kod oba uzorkovanja titrovi antitela bili veći ili jednako od 16 i za specifična antitela protiv oba suptipa virusa. Najveći titar protiv antigena virusa suptipa H3N8 je bio 128, a protiv antigena virusa suptipa H7N7 64.

### ***5.4.2. Rezultati HI testa kod vakcinisanih grla sa kliničkom simptomima***

Testom inhibicije hemaglutinacije nije otkriveno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa kako suptipa H7N7 tako i suptipa H3N8. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10, rezultati ukazuju da su sve životinje bile u kontaktu sa virusom, odnosno da su kod oba uzorkovanja titrovi antitela bili veći ili jednako od 16 i za specifična antitela protiv oba suptipa virusa. Najveći titar antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8 je bio 32 a protiv antigena virusa suptipa H7N7 64.

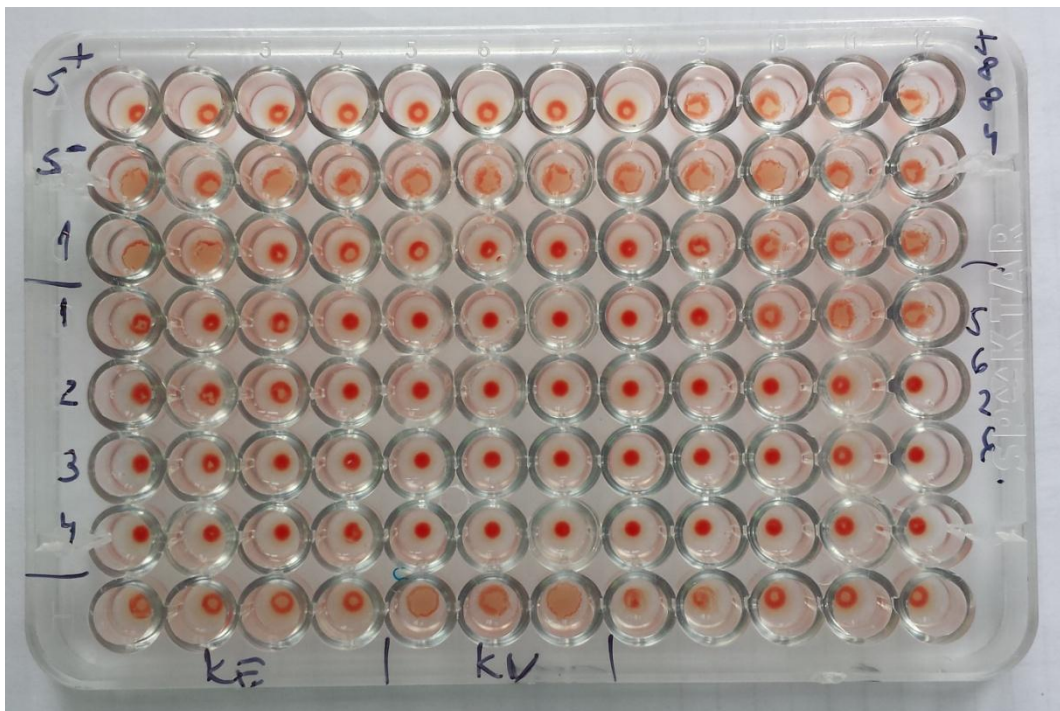
#### ***5.4.3. Rezultati HI testa kod nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma***

Testom inhibicije hemaglutinacije je kod 16 grla iz ove grupe (40%), utvrđeno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Kod 7 grla iz ove grupe (17,5%) postoji četverostruki ili veći porast titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Takođe 7 grla iz ove grupe je imalo pozitivan test inhibicije hemaglutinacije na oba suptipa. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10 rezultati ukazuju da je 38 grla iz ove grupe (95%) bilo u kontaktu virusom influence suptip H7N7, a da je 29 grla iz ove grupe (72,5%) bilo u kontaktu virusom influence suptip H3N8. Najveći titar antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8 je bio 64 kao i protiv antigena virusa suptipa H7N7.

#### ***5.4.4. Rezultati HI testa kod nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima***

Testom inhibicije hemaglutinacije je kod 2 grla iz ove grupe (40%), utvrđeno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Kod 7 grla iz ove grupe (17,5%) postoji četverostruki ili veći porast titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Takođe 7 grla iz ove grupe je imalo pozitivan test inhibicije hemaglutinacije na oba suptipa. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10 rezultati ukazuju da je 10 grla iz ove grupe (90,9%) bilo u kontaktu virusom influence suptip H7N7, a da je 9 grla iz ove grupe (81,81%) bilo u kontaktu virusom influence suptip H3N8. Najveći titar antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8 je bio 64 kao i protiv antigena virusa suptipa H7N7.





*Slika 20. Test ploča za HI test. Oznaka S+ predstavlja pozitivan serum, S- negativan serum, KE kontrola eritroita a KV kontrola virusa.*

### **5.5. Rezultati brzog testa - BD Directigen EZ Flu A+B**

Brzi test za dijagnostiku antigena virusa influence bio je pozitivan kod dva konja iz grupe nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma a negativan kod svih magaraca. Rezultati su prikazani u tabeli 14 a pozitivna test pločica na slici 20.



*Slika 20. Pozitivan test za influencu tip A (influenca A antigen prisutan)*

*Tabela 14. Prikaz grla kod kojih je brzim testom - BD Directigen EZ Flu A+B dokazano prisustvo antigena*

<b>Grlo</b>	<b>Direktigen test</b>
Konj 33	+
Konj 39	+

### *5.6. Rezultati dokazivanja prisustva genoma influenza virusa primenom metode RT-PCR*

U svim pregledanim uzorcima nazalnih briseva kopitara uključenih u ovo istraživanje, primenom metode RT-PCR nije dokazano prisustvo genoma influenza virusa.

## **5.7. Zbirni rezultati**

Zbirni rezultati za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a su prikazani u tabeli 12, 13, 14 i 15. U tabelama su prikazani podaci samo za parametre koji su odstupali od referentnih vrednosti.

### **5.7.1. Zbirni rezultati vakcinisana grla bez kliničkih simptoma**

Zbirni rezultati za vakcinisana grla bez kliničkih simptoma i to za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a su prikazani u tabeli 15.

**Tabela 15. Rezultati za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a za vakcinisana grla bez kliničkih simptoma**

	<b>Epizootiološki podaci</b>	<b>Klinički nalaz</b>	<b>Patomorfološki i patohistološki nalaz</b>	<b>Kompletna krvna slika</b>	<b>Parni H7N7</b>	<b>Parni H3N8</b>	<b>Titar ≥16 H7N7</b>	<b>Titar ≥16 H3N8</b>	<b>Direktigen</b>	<b>RT-PCR</b>
Konj 11	Američki kasač, 10g	-	-	Leukopenija limfopenija	-	-	+	+	-	-
Konj 12	Američki kasač, 7g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 13	Američki kasač, 8g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 54	Engleski punokrvnjak, 17g	-	-	Leukopenija limfopenija	+	-	+	+	-	-
Konj 55	Mađarski toplokrvni, 12g	-	-	Leukopenija limfopenija	+	-	+	+	-	-
Konj 56	Engleski punokrvnjak, 15g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 57	Mađarski toplokrvni, 10g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 58	Lipicaner, 22g	-	-	Anemija limfopenija	-	-	+	+	-	-
Ukupno	-	-	-	4	2	-	10	10	-	-
%	-	-	-	40	20	-	100	100	-	-

### ***5.7.2. Zbirni rezultati vakcinisana grla sa kliničkim simptomima***

Zbirni rezultati za vakcinisana grla sa kliničkim simptomima i to za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a su prikazani u tabeli 16.

**Tabela 16. Rezultati za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a za vakcinisana grla sa kliničkim simptomima**

	<b>Epizootiološk i podaci</b>	<b>Klinički nalaz</b>	<b>Patomorfološki i patohistološki nalaz</b>	<b>Kompletna krvna slika</b>	<b>Parni H7N7</b>	<b>Parni H3N8</b>	<b>Titar ≥16 H7N7</b>	<b>Titar ≥16 H3N8</b>	<b>Direktigen</b>	<b>RT- PCR</b>
Konj 14	Američki kasač, 10g	Serozni iscedak	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 15	Američki kasač, 20g	Serozni iscedak	-	-	-	-	+	+	-	-
Ukupno	-	2	-	-	-	-	2	2	-	-
%	-	2	-	-	-	-	100	100	-	-

### ***5.7.3. Zbirni rezultati nevakcinisana grla bez kliničkih simptoma***

Zbirni rezultati za nevakcinisana grla bez kliničkih simptoma i to za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a su prikazani u tabeli 17.

**Tabela 17. Rezultati za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a za nevakcinisana grla bez kliničkih simptoma**

	<b>Epizootiološki podaci</b>	<b>Klinički nalaz</b>	<b>Patomorfološki i patohistološki nalaz</b>	<b>Kompletna krvna slika</b>	<b>Parni H7N7</b>	<b>Parni H3N8</b>	<b>Titar ≥16 H7N7</b>	<b>Titar ≥16 H3N8</b>	<b>Direktigen</b>	<b>RT-PCT</b>
Mag. 2	Domaći, 5g	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Mag. 3	Domaći, 9g	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Mag. 4	Domaći, 5g	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Konj 6	Lipicaner, 3g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 7	Nonius, 22g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 8	Nonius, 19g	-	-	Leukopenija limfopenija	-	-	+	+	-	-
Konj 10	Lipicaner, 15g	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Konj 16	Engleski polukrvnjak, 8m	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Konj 17	Lipicaner, 18m	-	-	Anemija limfopenija	-	-	+	+	-	-
Konj 18	Engleski polukrvnjak, 10g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konj 21	Engleski polukrvnjak, 2,5g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 22	Engleski polukrvnjak, 5m	-	-	-	-	-	+	+	-	-



Konj 23	Engleski polukrvnjak, 4g	-	-	Leukocitoza	-	-	+	+	-	-
Konj 24	Lipicaner, 3g	-	-	Leukocitoza granulocitoza limfopenija	-	-	+	-	-	-
Konj 25	Lipicaner, 18m	-	-	Granulocitoza limfopenija	-	-	+	-	-	-
Konj 26	Lipicaner, 10g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 27	Engleski polukrvnjak, 5g	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Konj 28	Engleski polukrvnjak, 10g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 29	Lipicaner, 25m	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 30	Engleski polukrvnjak, 10g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 31	Poni, 4g	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Konj 33	Engleski polukrvnjak, 8g	-	-	Leukopenija limfopenija	-	+	+	+	+	-
Konj 34	Lipicaner, 11g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 36	Engleski polukrvnjak, 5g	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Konj 37	Engleski polukrvnjak, 11g	-	-	Limfopenija	-	+	+	+	-	-
Konj 38	Araber, 15g	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Konj 39	Engleski polukrvnjak, 11g	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Konj 41	Engleski polukrvnjak, 6g	-	Infiltracija bronhiola makrofazi u nazalnom brisu	Limfopenija	+	+	+	+	-	-
Konj 42	Nonius, 22g	-	Opstrukcija bronhija, makrofazi u nazalnom brisu	Leukocitoza granulocitoza limfocitoza	-	-	+	+	-	-
Konj 43	Lipicaner, 8m	-	-	Leukocitoza limfocitoza	+	+	+	+	-	-
Konj 44	Haflinger, 5g	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 45	Haflinger, 4g	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Konj 46	Haflinger, 1g	-	-	Leukopenija limfopenija	-	+	+	+	-	-
Konj 47	Haflinger, 4g	-	-	-	+		+		-	-
Mag. 48	Banatski, 9g	-	-	Leukocitoza, granulocitoza	+	+	+	+	-	-
Mag. 49	Banatski, 6g	-	-	Leukocitoza granulocitoza limfocitoza	+	+	+	+	-	-
Mag. 50	Banatski, 5g	-	-	Leukocitoza granulocitoza limfocitoza	-	+	+	+	-	-
Mag. 52	Banatski, 6g	-	-	Leukocitoza	-	-	-	+	-	-
Konj 60	Engleski polukrvnjak, 6g	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Konj 61	Lipicaner, 17g	-	-	Granulocitoza	-	-	-	-	-	-
Ukupno	-	-	-	24	11	16	58	48	2	-
%	-	-	-	39,34	18,03	26,23	95,08	78,69	3,28	-

#### ***5.7.4. Zbirni rezultati nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima***

Zbirni rezultati za nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima i to za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a su prikazani u tabeli 18.

**Tabela 18. Rezultati za epizootiološke podatke, klinički nalaz, patomorfološki i patohistološki nalaz, kompletnu krvnu sliku, HI testa, Direktigen testa i RT-PCR-a za nevakcinisana grla sa kliničkim simptomima**

	<b>Epizootiološk i podaci</b>	<b>Klinički nalaz</b>	<b>Patomorfološki i patohistološki nalaz</b>	<b>Kompletna krvna slika</b>	<b>Parni H7N7</b>	<b>Parni H3N8</b>	<b>Titar ≥16 H7N7</b>	<b>Titar ≥16 H3N8</b>	<b>Direktigen</b>	<b>RT- PCR</b>
Konj 1	Lipicaner, 5g	Serozni iscedak, kašalj	-	Leukopenija limfopenija	-	-	+	-	-	-
Mag. 5	Domaći, 24g	Serozni iscedak, krepitacije	-	-	-	-	+	-	-	-
Konj 9	Lipicaner, 4g	Serozni iscedak	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 19	Lipicaner, 10m	Kašalj	-	Leukocitoza limfocitoza	-	-	+	+	-	-
Konj 20	Lipicaner, 10m	Kašalj	-	Granulocitoza limfopenija	-	-	+	+	-	-
Konj 32	Lipicaner, 7g	Kašalj	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 35	Lipicaner, 5g	Serozni iscedak	-	-	-	-	+	+	-	-
Konj 40	Engleski polukrvnjak	Mukopurulentni iscedak, krepitacije, kašalj, uvećanje submandibularnih limfnih čvorova	Apsces u plućima, suženje lumena bronhiola, makrofazi u nazalnom brisu	Leukocitoza granulocitoza, limfocitoza	-	+	+	+	-	-
Mag. 51	Banatski, 4g	Konjuktivitis	-	Anemija	-	+	+	+	-	-

*Mihajlo Erdeljan**Doktorska disertacija**Rezultati*

Mag. 53	Domaći, 4g	Konjuktivitis	-	-	+	-	+	+	-	-
Konj 59	Američki kasač, 6g	Serozni iscedak	-	Anemija, granulocitza	-	-	+	+	-	-
Ukupno	-	11	-	24	11	16	58	48	2	-
%	-	18,03	-	39,34	18,03	26,23	95,08	78,69	3,28	-

## ***5.8. Rezultati patomorfoloških, patohistoloških i citoloških ispitivanja***

Pregledom patohistoloških preparata pluća nađene su promene karakteristične za hronična oboljenja pluća. Deo promena se uočavao i makroskopski, u vidu apscesa, ostale promene su uočene mikroskopski.

Na makroskopskom pregledu pluća mogli su se uočiti solitarni plućni granulomi (slika 21), zatim mukopurulent sadržaj u traheji i plućima. Uočavala se diskoloracija i prominirajući solitarni plućni granulomi tvrde konzistencije koji su bili jasno ograničen od okolnog plućnog tkiva. Na poprečnom preseku granuloma uočavala se beličasto-sivkasta masa konzistencije mladog sira.

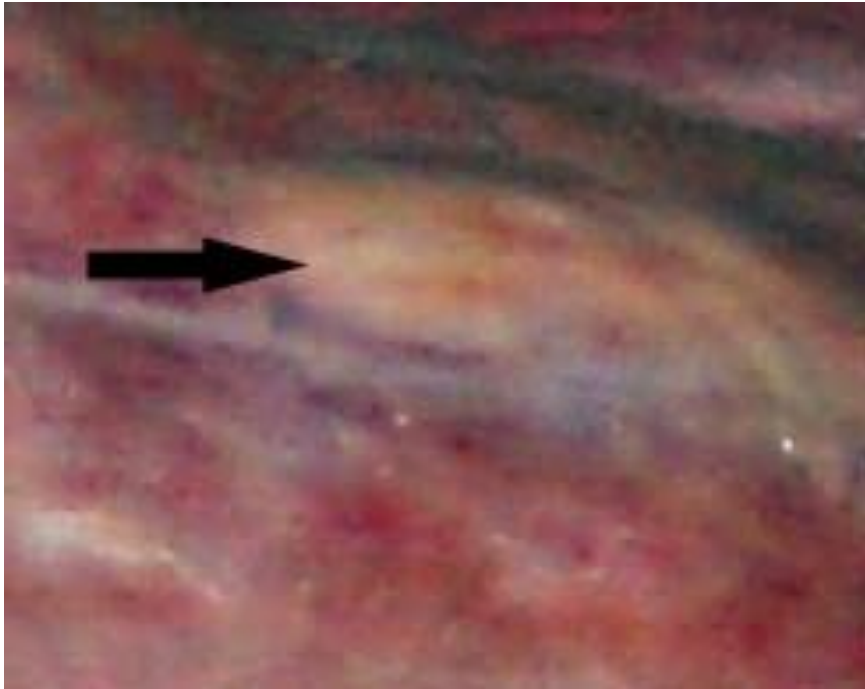
Na mikroskopskom pregledu, na malom uveličanju (10X) bila je uočena ograničena šupljina sa gnojnom nekrozom i likvefakcijom (slika 22). Zid apscesa je bio formiran od granulacionog tkiva.

Na velikom uveličanju (100X) mogla se uočiti piogena membrana formirana od granulacionog tkiva (slika 23), takođe su se mogli uočiti i neutrofilni granulociti. Gledano od piogene membrane ka centru apscesa uz sam rug membrane mogli su se uočiti neutrofilni granulociti.

Osim pojave apscesa, koji se mogao uočiti i mikroskopski i makroskopski, na patohistološkom pregledu, na srednjem uveličanju (40X), moglo se uočiti suženje lumena bronhija i peribronhialna proliferacija vezivnog tkiva i infiltraciji limfocita (slika 24). Tako je lumen bronhija bio skoro potpuno ispunjen sadržajem koji dovodi do opstruktivnih smetnji. Takođe, uočeno je postojanje peribronhialne proliferacije vezivnog tkiva i infiltracija limfocita. Dalje, na srednjem uveličanju (40X) moglo se uočiti zadebljanje epitela sa sadržajem u bronhijalnom lumenu i infiltracijom limfocita (slika 25), gde je hiperplazija epitela bronhiola sa prominiranjem u lumen samih bronhija i nakupina seroznog sadržaja u lumenu dovela do opstrukcije disajnih puteva.

Na velikom uveličanju (100X) mogao se detektovati i sadržaj opstruktivnog materijala – detritus ćelije, limfociti, neutrofilne ćelije i retki alveolarni makrofagi, zadebljanje epitela i peribronhialna infiltracija (slika 26).

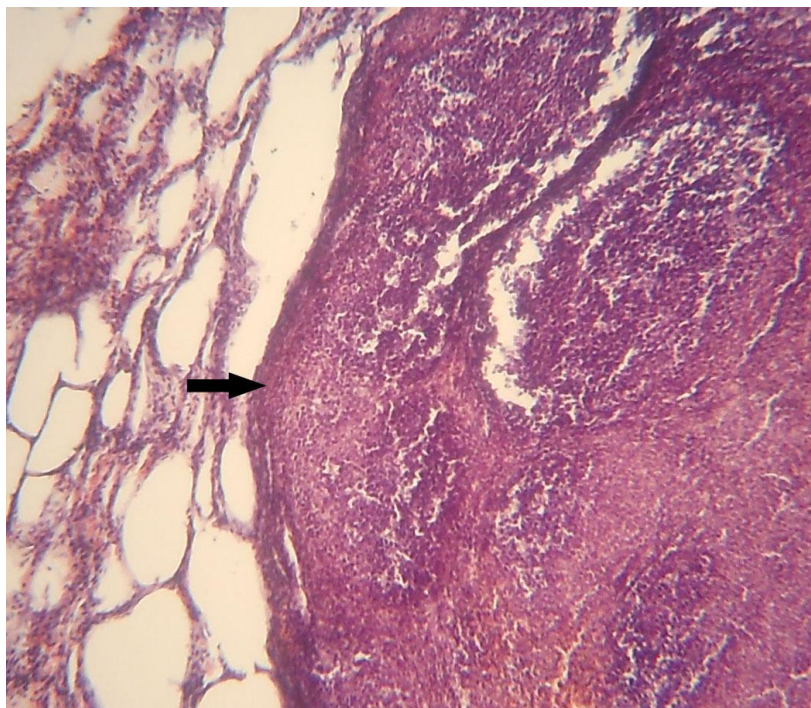
U pojedinim delovima pluća mogla se dijagnostikovati fibroza peribronhialnog prostora i intersticijum infiltriran sa eritrocitima i limfocitima srednje gustine. Proliferacija vezivnog tkiva u peribronhijalnom prostoru koje je vršilo pritisak na bronhiole i menjalo veličinu i izgled lumena bronhija uz stvaranje lokalne hiperemije moglo se uočiti na srednjem uveličanju (40X) (slika 27).



*Slika 21. Makroskopski snimak apscesa u plućnom parenhimu.*

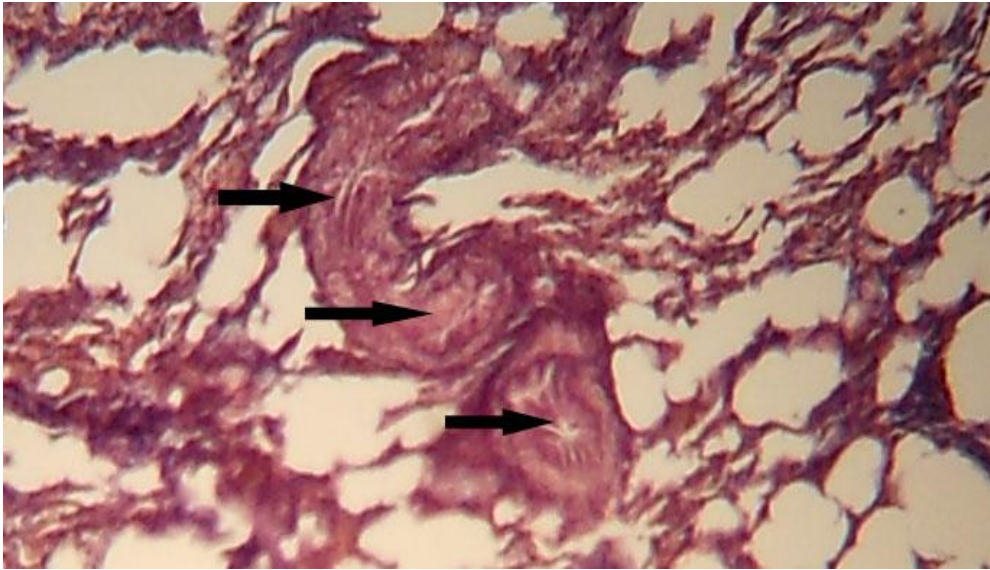


*Slika 22. Plućni parenhim sa granulomom u čijem je centru gnoj, oivičen granulacionim tkivom (apsces), H&E, 10X.*

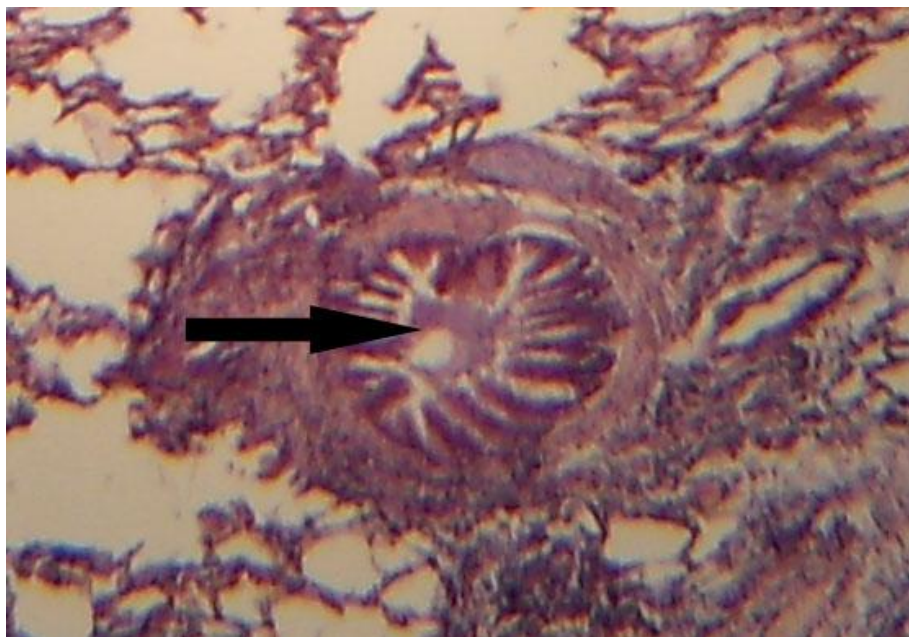


*Slika 23. Uzorak parenhima pluća, strelica ukazuju na piogenu membranu u plućnom parenhimu, H&E, 100X.*

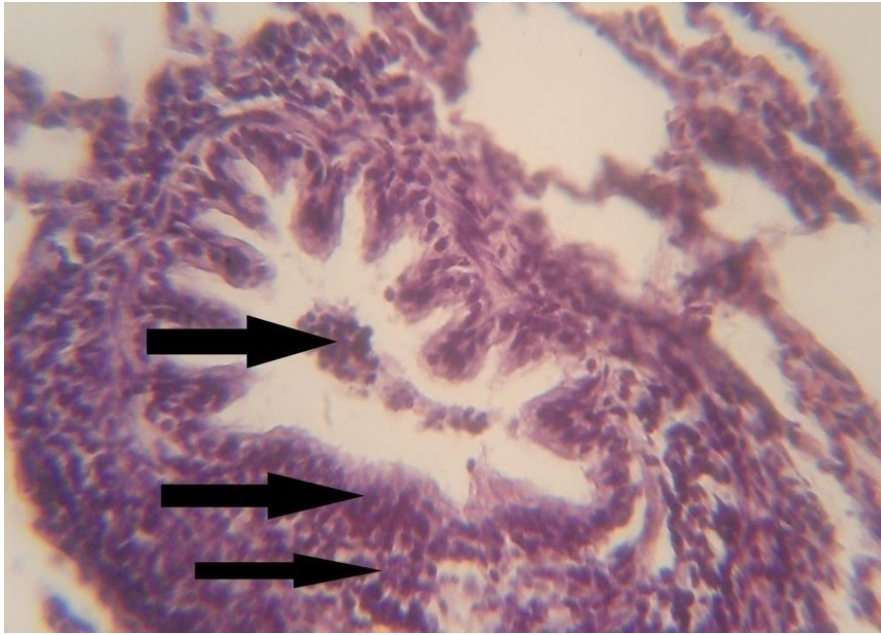




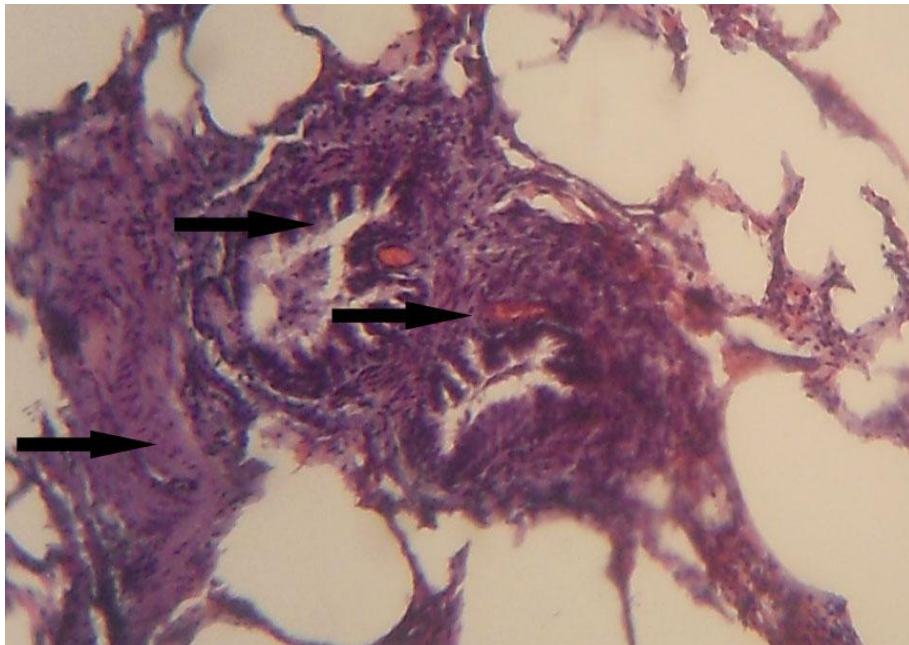
*Slika 24. Uzorak parenhima pluća, strelice ukazuju na tri bronchiole sa oko 90% sužavanja, H&E, 40X.*



*Slika 25. Uzorak tkiva pluća, strelica ukazuje na zadebljanja epitela sa sadržajem u bronhijalnom lumenu i infiltraciju limfocita, H&E, 40X.*

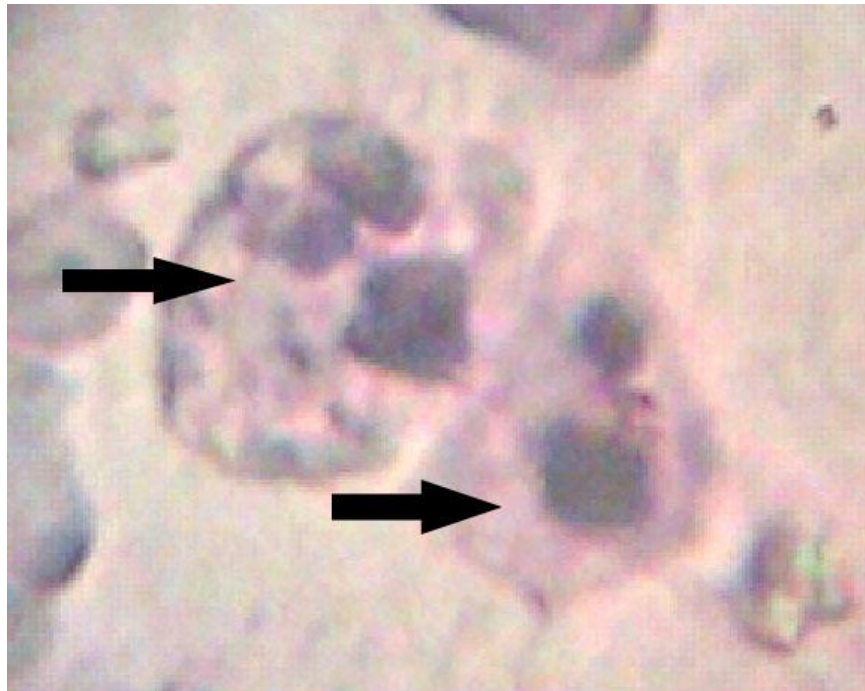


*Slika 26. Uzorak plućnog parenhima, uzet od mladog pastuva, H&E, 100X.*



*Slika 27. Uzorak plućnog tkiva, uzet od 5 godina stare kobile, H&E, 40X.*

Citološka ispitivanja trahealnog brisa pokazala su prisustvo makrofaga (slika 28). U makrofazima se uočava okruglasto jedro. Periferno se uočavalo postavljeno jedro sa citoplazmom i aktivnim vakuolama u toku fagocitoze.



*Slika 28. Prikaz makrofaga u trahealnom sekretu, Giemsa, 100X.*

### **5.9. Rezultati statističke analize**

Unakrsni odnos između nalaza kliničkog pregleda i broja vakcinisanih životinja. Izračunat unakrsni odnos (OR) iznosi 0,90 i ukazuje da ne postoji značana povezanost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i njihovog vakcinalnog statusa. Rezultati su prikazani u tabelama 19 i 20.

Tabela 19. Open epi 2x2 tabela za unakrsni odnos vakcinacije i kliničkog nalaza

## 2 x 2 Table Statistics

**Single Table Analysis**

		Klinički	
		(+)	(-)
Vakcinacija	(+)	2	8
	(-)	11	4051
		13	4861

Tabela 20. Rezultati unakrsnog odnosa vakcinacije i kliničkog nalaza

Odds-Based Estimates and Confidence Limits			
Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	
CMLE Odds Ratio*	0.9105	0.1174, 4.665 <sup>1</sup>	
		0.08277, 5.581 <sup>1</sup>	
Odds Ratio	0.9091	0.1683, 4.912 <sup>1</sup>	
Prevented fraction in pop(PFpOR)	1.515%	-33.82, 22.09	
Prevented fraction in exposed(PFeOR)	9.091%	-391.2, 83.17	

\*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio

(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.

Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology 2, 359-362.

<sup>1</sup> 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated

P-values < 0.05 and confidence limits excluding null values (0,1, or [n]) are highlighted.

LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.

Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--TwobyTwo

Unakrsni odnos između nalaza kliničkog pregleda i serološkog nalaza (HI test) H7N7. Izračunat unakrsni odnos (OR) iznosi 5,05 i ukazuje da postoji značana povezanost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i utvrđenog seropozitivnog nalaza primenom HI testa. Rezultati su prikazani u tabelama 21 i 22.

**Tabela 21. Open epi 2x2 tabela za unakrsni odnos kliničkog nalaza i HI testa za suptip H7N7**

## 2 x 2 Table Statistics

### Single Table Analysis

		HI test	
		(+)	(-)
Klinički	(+)	7	6
	(-)	9	3948
		16	4561

**Tabela 22. Rezultati unakrsnog odnosa kliničkog nalaza i HI testa za suptip H7N7**

Odds-Based Estimates and Confidence Limits			
Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower; Upper	
CMLE Odds Ratio*	4.89	1.292, 19.32 <sup>†</sup>	1.113, 22.78 <sup>†</sup>
Odds Ratio	5.056	1.365, 18.72 <sup>†</sup>	
Etiologic fraction in pop.(EFp OR)	35.1%	6.081, 64.11	
Etiologic fraction in exposed(EFe OR)	80.22%	26.75, 94.66	

\*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio

(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.

Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology 2, 362.

<sup>†</sup> 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated

P-values < 0.05 and confidence limits excluding null values (0,1, or [n]) are highlighted.

LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.

Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--TwobyTwo

Unakrsni odnos između nalaza kliničkog pregleda i serološkog nalaza (HI test) H3N8. Izračunat unakrsni odnos (OR) iznosi 0,36 i ukazuje da ne postoji značana povezanost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i utvrđenog seropozitivnog nalaza primenom HI testa. Rezultati su prikazani u tabelama 23 i 24.

Tabela 23. Open epi 2x2 tabela za unakrsni odnos kliničkog nalaza i HI testa za suptip H3N8

## 2 x 2 Table Statistics

### Single Table Analysis

		HI test	
		(+)	(-)
Klinički	(+)	2	1113
	(-)	16	3248
		18	4361

Tabela 24. Rezultati unakrsnog odnosa kliničkog nalaza i HI testa za suptip H3N8

Odds-Based Estimates and Confidence Limits			
Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	
CMLE Odds Ratio*	0.3689	0.05027, 1.716 <sup>†</sup>	
Odds Ratio	0.3636	0.03562, 2.01 <sup>†</sup>	
Prevented fraction in pop(PFpOR)	16.28%	-10.09, 32.46	
Prevented fraction in exposed(PFeOR)	63.64%	-84.05, 92.82	

\*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio

(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.

Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology : 359-362.

<sup>†</sup> 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated

P-values < 0.05 and confidence limits excluding null values (0,1, or [n]) are highlighted.

LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.

Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--TwobyTwo

## 6. DISKUSIJA

Influenca je kod kopitara zabeležena u literaturi verovatno još u Antičkoj Grčkoj. Pouzdani istorijski zapisi potiču iz 1874. godine (Thiemann i Bell, 2001.). Influenca kopitara je akutno respiratorno oboljenje sa kliničkom slikom u tipu respiratornog sindroma.

Ovo oboljenje izazivaju dva suptipa influenza A virusa (EIV – ekvini influenza virus) – H7N7 (ranije poznat kao tip 1) i H3N8 (ranije poznat kao tip 2) iz familije *Orthomyxoviridae*, sa naznakom da H7N7 virus nije izolovan kod kopitara već duže vreme (Ataseven i Daly, 2007.). H7N7 suptip je prvi put izolovan kod konja u Čehoslovačkoj 1956 (Prague/56), a H3N8 subtip je prvi put izolovan kod konja u Majamiju 1963. Izbijanje influence kopitara zabeleženo je u celom svetu osim na malom broju ostrva i na Novom Zelandu i Islandu (Culliname i Newton, 2013).

Poslednja potvrđena epidemija suptipa H7N7 je bila 1979, i ovaj suptip se sada smatra ili iskorenjenim ili slabo aktivnim i to u malom broju ograničenih geografskih oblasti (van Maanen i Cullinane 2002). Međutim, H7N7 je serološki dokazan i kod vakcinisanih i nevakcinisanih konja u Turskoj (Ataseven i Daly, 2007.), Izraelu (Aharonson-Raz i sar., 2014.), Brazilu (Heinemann i sar., 2009.; Mancini i sar., 2014.) i Nigeriji (Olusa i sar., 2010.).

Virus H3N8 subtip je uobičajeni uzročnik infekcije influencom kod kopitara širom sveta, posebno u oblastima gde se vakcinacija rutinski ne sprovodi (Paillot i sar., 2006).

Influenca A virus je visoko kontagiozni uzročnik za kopitare (Hannant i Mumford 1996., Palese i Shaw 2007.) i najčešće se brzo širi u zapatima imunološki nekompetentnih kopitara. Morbiditet iznosi 10-100%, dok mortalitet 0,5-10% (Trailović, 2000.).

Klinički znaci su slični kod magaraca i kod konja a to su: pireksija, dispnoa, kašalj, iscedak iz nosa, anoreksija, depresija i inapetencija. Tokom infekcije sa virusom influence može doći do komplikacija usled sekundarne bakterijske infekcije što može otežati dalji tok bolesti i dovesti do pneumonije i smrti. Međutim, u velikom broju eksperimentalnih ispitivanja kao i u prirodnim epidemijama (Abdalla i sar., 1993.; Chenchev i sar., 1992.; Holland i sar., 1999.) pokazalo se da je smrtnost veća a klinički znaci izraženiji kod magaraca u odnosu na konje. Utvrđeno je takođe, da zaraženi magarci imaju veću predispoziciju ka razvijanju sekundarnih bakterijskih bronhopneumonija. Drugi autori pak navode postojanje

udružene infekcije sa plućnim vlašcima (Rose i sar., 1970.). Zbog većeg morbiditeta i mortaliteta potrebno je primenjivati efikasnu vakcinaciju protiv influence, a prilikom lečenja koristi i tretman protiv plućnih vlašaka uz terapiju antibioticima u cilju suzbijanja sekundarne bakterijske bronhopneumonije (Caerwell i sar., 2000.). Ovo oboljenje je veoma kontagiozno i prenosi se najčešće u direktnom kontaktu. Kod konja obično prolazi bez značajnih posledica, ali može dovesti do gubitka radne sposobnosti pa čak i do uginuća.

Brza i pouzdana dijagnostika odnosno izolacija sumnjivih jedinki predstavljaju prvu liniju odbrane protiv epidemija influence kopitara. Prepoznavanje kliničkih znakova (groznica, depresija, oštar kašalj i sekret iz nosa) uz poznavanje epizotoloških podataka daje osnov za rano otkrivanje infekcije. U nekim slučajevima kašalj i brzo širenje simptoma kašlja u grupi konja koji su ili nevakcinisani protiv virusa influence ili nisu bili u kontaktu sa virusom influence mogu jasno ukazati na influencu (Kobluk i sar., 1995).

Konačna dijagnoza se može postaviti kroz različite dijagnostičke postupke, koji obuhvataju klinički pregled, brzi terenski test, hematološki nalaz i upotrebom standardizovanih seroloških testova i izolacijom virusa influence.

Epizotološki podaci prikupljeni tokom ovog istraživanja pokazali su da je u datoj populaciji od 61 grla samo 10 grla, odnosno 16,39%, bilo redovno vakcinisano protiv virusa influence. Literaturni podaci govore da je potrebno da oko 70% kopitara u datoj populaciji bude potpuno imunizovano da bi se preveniralo izbijanje epizotije influence (Baker JD, 1986.), što je veoma važno jer se smatra da je vakcinacija je ključ za kontrolu virusa influence A (Perglione, 2015.). Treba napomenuti da su sva sportska grla koja su učestvovala u ovom istraživanju bila redovno vakcinisana.

Kliničkim pregledom je ustanovljeno kod 2 od 10 vakcinisanih grla ispoljavanje nekog od kliničkih simptoma koje se mogu povezati sa influencom, dok je kod 11 od 51 nevakcinisanog grla dijagnostikovao neki od ovih simptoma. Najizraženiji simptomi su bili serozan ili mukopurulentan iscedak iz nosa, krepitacije, kašalj, konjuktivitis i uvećanje submandibularnih limfnih čvorova. Ovi klinički simptomi su u skladu sa navodima drugih autora, osim izostanka povišene telesne temperature. Oni navode da je prvi znak povišena telesna temperatura (do 41° C) (Sellon i Long, 2014.), zatim sledi iscedak iz nosa koji je u početku serozan a kasnije počinje da bude tipično mukopurulentan (Landolt i sar., 2014.), kojeg prati duboki suvi spontani kašalj (Legrand i sar., 2013.). Svi ovi klinički simptomi su prilikom drugog pregleda ili nestali ili bili manje izraženi.

Analizom kompletne krvne slike utvrđeno je kod 4 grla (50%) iz grupe vakcinisanih grla bez kliničke slike postojanje anemije, limfopenije i leukopenije, kod grupe vakcinisanih



grla sa kliničkim simptomima bio je fiziološki nalaz kompletne krvne slike, kod grupe nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma 15 grla (37,5%) je imalo neki od parametara koji je bio van referentnih vrednosti i to u vidu postojanja anemije, limfopenije, leukopenije, leukocitoze, monocitoze ili leukocitoze sa neutrofilijom, kod grupe nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima 6 grla (54,55%) je na hematološkom nalazu pokazalo neke od parametara koji su van referentnih vrednosti, odnosno postojanje anemije, limfopenije, leukopenije, leukocitoze, monocitoze ili leukocitoze sa neutrofilijom. Ovi nalazi su u skladu sa drugim autorima koji navode da se virusne infekcije najčešće manifestuju promenama broju ćelija bele krvne loze i to u vidu limfopenije i neutropenije i ponekad limfocitoze (Townsend i sar, 1997.). Hematološki nalaz kod infekcije sa ekvinim virusom influence obuhvata umerenu normocitnu, normohromnu anemiju (Gerber, 1970.). Periodična replikacija virusa infektivne anemije kopitara u makrofagima dovodi do imunološki posredovane akutne bolesti koju karakterišu prvenstveno teške anemije (Cheevers i McGuire, 1985.; Trailović, 2011.). U prirodnim i eksperimentalnim infekcijama dokazano je smanje broja leukocita tokom celog perioda bolesti dok je broj eritrocita smanjen samo na početku bolesti (Krumrych i sar., 1999.). Leukogram tipično pokazuje leukopeniju koja obično nastaje kao posledica neutropenije i limfopenije sa trajanjem od 3 do 5 dana (Nelson, 1995.). Neutropenija nije uobičajeni nalaz a odnos neutrofilija/limfocita je obično povećan tokom ovog perioda (Matroshovich i sar., 2004.). Monocitoza tokom rane kovalescencije je varijabilni nalaz (Martin i sar., 1959.).

Testom inhibicije hemaglutinacije (RIHA) je kod 2 konja iz grupe vakcinisanih grla bez kliničkih simptoma (25%), utvrđeno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Sve životinje su bile negativne na povećanje titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10, rezultati ukazuju da su sve životinje bile u kontaktu sa virusom, odnosno da su kod oba uzorkovanja titrovi antitela bili veći ili jednako od 16 i za specifična antitela protiv oba suptipa virusa. Kod grupe vakcinisanih grla sa kliničkom simptomima testom inhibicije hemaglutinacije nije otkriveno postojanje četverostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa kako suptipa H7N7 tako i suptipa H3N8. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10, rezultati ukazuju da su sve životinje bile u kontaktu sa virusom, odnosno da su kod oba uzorkovanja titrovi antitela bili veći ili jednako od 16 i za specifična antitela protiv oba suptipa virusa. Kod grupe nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma testom inhibicije hemaglutinacije je kod 16 grla (40%), utvrđeno postojanje

četvorostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Kod 7 grla iz ove grupe (17,5%) postoji četvorostruki ili veći porast titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Takođe 7 grla iz ove grupe je imalo pozitivan test inhibicije hemaglutinacije na oba suptipa. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10 rezultati ukazuju da je 38 grla iz ove grupe (95%) bilo u kontaktu virusom influenza suptip H7N7, a da je 29 grla iz ove grupe (72,5%) bilo u kontaktu virusom influenza suptip H3N8. Kod grupe nevakcinisanih grla sa kliničkim simptomima testom inhibicije hemaglutinacije je kod 2 grla (40%), utvrđeno postojanje četvorostrukog ili većeg porasta titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H3N8. Kod 7 grla iz ove grupe (17,5%) postoji četvorostruki ili veći porast titra specifičnih antitela protiv antigena virusa suptipa H7N7. Takođe, 7 grla iz ove grupe je imalo pozitivan test inhibicije hemaglutinacije na oba suptipa. Ako se kao granični titar za kontakt sa virusom uzme titar veći ili jednak sa 10 rezultati ukazuju da je 10 grla iz ove grupe (90,9%) bilo u kontaktu virusom influenza suptip H7N7, a da je 9 grla iz ove grupe (81,81%) bilo u kontaktu virusom influenza suptip H3N8. Tako se dolazi do podatka da 20% vakcinisanih grla je serološki pozitivno na virus influenza kopitara istovremeno sa 45,09% nevakcinisanih grla. Ukupno gledano seroprevalenca iznosi 40,09%. Ovakvi nalazi nešto veći nego oni koji navode drugi autori tako seroprevalenca kod magarca u Pakistanu iznosi 12% (Sijad i sar., 2012.), odnosno 9,4% u Turskoj (Ataseven i Daly, 2008.). Od istraživanja u našoj zemlji na kopitarima dokazano je prisustvo specifičnih antitela u 17 od 64 uzorka (26,5%) ispitivanih krvnih seruma magaraca sa lokaliteta Zasavica, i to na serotipove H5N1 i H7N2 virusa avijarne influenza (Đuričić i sar., 2010.). Serološki na nalaz suptipa H7N7 potvrđuje nalaze drugih autora koji su serološki dokazali prisustvo H7N7 suptipa i kod vakcinisanih i nevakcinisanih konja u Turskoj (Ataseven i Daly, 2007.), Izraelu (Aharonson-Raz i sar., 2014.), Brazilu (Heinemann i sar., 2009.; Mancini i sar., 2014.) i Nigeriji (Olusa i sar., 2010.), iako pojedini autori navode da je taj suptip zadržan samo na veoma niskom nivou u nekim delovima sveta, i da postoji mogućnost i da je potpuno nestao (Madić i sar., 1996.). Drugi autori, takođe, navode da su poznati slučajevi pozitivne dijagnoze (izolacijom, serološki) influenza bez kliničke slike i bez širenja na druge životinje u štalama punokrvnih trkačkih konja (Daly i Mumford 2001.).

Brzi test za dijagnostiku antigena virusa influenza bio je pozitivan kod dva konja iz grupe nevakcinisanih grla bez kliničkih simptoma. Ovaj rezultat se može uporediti sa nalazima autora (Morley i sar., 1995.) koji su imali poteškoće u izolaciji virusa u epidemiji, ali su ELISA testom dokazali prisustvo virusnog antigena. Dok su pojedini autori navode

(Chamber, 1994.) da se ovim testom može otkriti 90% inficiranih grla kada se uzorkovanje obavlja u ranoj fazi bolesti, drugi autori (Quinlivan i sar., 2004.) su identifikovali virus u 100% slučajeva kod inficiranih ždrebadi sa Evropskom sojem virusa H3H8, i pri tom nisu utvrdili visoku korelaciju između količine virusa u brisevima i sposobnosti Direktigen test za otkrivanje virusa. Međutim, negativan Direktigen test ne isključuje prisustvo virusa.

U svim pregledanim uzorcima nazalnih briseva kopitara uključenih u ovo istraživanje, primenom metode RT-PCR nije dokazano prisustvo genoma influenza virusa. Što nije u skladu sa navodima autora čije studije pokazuju da je od svih testova PCR najsenzitivniji (Quinlivan i sar., 2004.). Međutim analizom pojedinih metoda dijagnostike drugi autori dobili su različite rezultate kada se uporede različite metode, tako su Pasick i saradnici (2007.) dobili pozitivan nalaz antitela na NP influenza A virusa kod gusaka i to kod 10 od 12 jedinki a kod jedne vrlo visoke titrove sa HI testom ali su svi brisevi obrađeni sa RT-PCR bili negativni sa zaključkom da se u trenutku uzimanja uzoraka nije radilo o aktivnoj infekciji. Takođe drugi autori su ima slične PCR negativne pacijente kod kojih je dokazan HI testom značajan porast titra antitela na influence tipa A ali je PCR bio negativan (Wallace i sar., 2004.).

Pregledom patohistoloških preparata pluća nađene su promene karakteristične za hronična oboljenja pluća. Deo promena se uočavao i makroskopski, u vidu apscesa, ostale promene su uočene mikroskopski. Na makroskopskom pregledu pluća mogli su se uočiti solitarni plućni granulomi, zatim mukopurulent sadržaja u traheji i plućima. Uočavala se diskoloracija i prominirajući solitarni plućni granulomi tvrde konzistencije koji su bili jasno ograničen od okolnog plućnog tkiva. Na poprečnom preseku granuloma uočavala se beličasto-sivkasta masa konzistencije mladog sira. Na mikroskopskom pregledu, na malom uveličanju (10X) bila je uočena ograničena šupljina sa gnojnom nekrozom i likvefakcijom. Zid apscesa je bio formiran od granulacionog tkiva. Na velikom uveličanju (100X) mogla se uočiti piogena membrana formirana od granulacionog tkiva, takođe su se mogli uočati i neutrofilni granulociti. Gledano od piogene membrane ka centru apscesa uz sam rug membrane mogli su se uočati neutrofilni granulociti. Osim pojave apscesa, koji se mogao uočiti i mikroskopski i makroskopski, na patohistološkom pregledu, na srednjem uveličanju (40X), moglo se uočiti suženje lumen bronhija i peribronhialna proliferacija vezivnog tkiva i infiltraciji limfocita. Tako je lumen bronhija bio skoro potpuno ispunjen sadržajem koji dovodi do opstruktivnih smetnji. Takođe, uočeno je postojanje peribronhialne proliferacije vezivnog tkiva i infiltracija limfocita. Dalje, na srednjem uveličanju (40X) mogao se uočiti zadebljanje epitela sa sadržajem u bronhijalnom lumenu i infiltracijom limfocita, gde je

hiperplazija epitela bronhiola sa prominiranjem u lumen samih bronhija i nakupina seroznog sadržaja u lumenu dovela do opstrukcije disajnih puteva. Na velikom uvećanju (100X) mogao se detektovati i sadržaj opstruktivnog materijala – detritus ćelije, limfociti, neutrofilne ćelije i retke alveolarni makrofagi, zadebljanje epitela i peribronhialna infiltracija. U pojedinim delovima pluća mogla se dijagnostikovati fibroza peribronhialnog prostora i intersticijum infiltriran sa eritrocitima i limfocitima srednje gustine. Proliferacija vezivnog tkiva u peribronhijalnom prostoru koje je vršilo pritisak na bronhiole i menja veličinu i izgled lumena bronhija uz srvaranje lokalne hiperremije moglo se uočiti na srednjem uvećanju (40X). Ovi navodi korenspondiraju sa navodima drugih autora koji su dijagnostikovali prisustvo mukusa u visokom nivou, skoro kod svih konja (94,12%) sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (Marinković i sar., 2007.), odnosno kod konja sa bronhopneumonijom kontaminirana pluća sa brojnim intra alveolarnim i nešto manje brojnim intrabronhiolarnim neutrofilima pomešanih sa makrofazima, fibrinom, i akutnim hemoragijama (DebRoy i sar., 2008.). Nalazi se takođe slažu sa navodima drugih autora koji navode da u slučajevima hroničnih bolesti pluća kod konja postoji peribronhialna i peribronhiolarna infiltracija limfocitima, makrofazima, eozinofilnim granulocitima i plazma ćelijama (Robinson, 2001.)

Izračunat unakrsni odnos (OR) između nalaza kliničkog pregleda i broja vakcinisanih životinja iznosi 0,90 i ukazuje da ne postoji značana povezenost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i njihovog vakcinalnog statusa. Izračunat unakrsni odnos (OR) između nalaza kliničkog pregleda i serološkog nalaza (HI test) H7N7 iznosi 5,05 i ukazuje da postoji značana povezenost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i utvrđenog seropozitivnog nalaza primenom HI testa. Izračunat unakrsni odnos (OR) nalaza kliničkog pregleda i serološkog nalaza (HI test) H3N8 iznosi 0,36 i ukazuje da ne postoji značana povezenost između ispoljenje kliničke slike kod pregledanih kopitara i utvrđenog seropozitivnog nalaza primenom HI testa. Unakrsni odnos (odds ratio) su koristili i drugi autori (Larson i sar., 2015.) uz dobijene slične rezultate. Nepostojanje značajne povezanosti između kliničke slike i vakcinacije može se povezati sa navodima autora koji navode da usled antigenskog drifta između vakcinalnog i ciklušućeg soja moguća je pojava kliničkih znakova oboljenja i kod vakcinisanih i kod nevakcinisanih životinja (Barbić i sar., 2009), jer antigenski drift kompromituje efikasnost vakcina kao sposobnost vakcinalnih antitela da prepoznaju terenski virus a samim time da štite životinju od kliničkih bolesti i da smanjuju širenje virusa (Gildea i sar., 2013.). Uprkos opsežnoj upotrebi vakcina, izbijanje bolesti se beleži i dalje (Bountouri i sar., 2011.). Takođe patogenost virusa je multigenetska osobina

(Wright i sar., 2007.), tako da ne samo suptip određuje patogenost odnosno ispoljenost kliničke slike.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata istraživanja izdedeni su sledeći zaključci:

1. Rezultati sprovedene epizootiološke ankete ukazuju da postoji veliki broj konja i magaraca u slobodnoj populaciji koji se ne vakcinišu protiv virusa influence ili se to radi ne redovno.
2. Kliničkim pregledom kopitara uključenih u ovo istraživanje, otkriveno je da postoji 20% životinja sa ispoljenom kliničkom slikom u tipu respiratornog sindroma.
3. Serološkim ispitivanjima je dokazano postojanje akutnog toka influence kopitara izazvane suptipom virusa H3N8 kod 26% jedinki, kao i izazvane suptipom H7N7 kod 18% jedinki. Nadalje, rezultati seroloških ispitivanja su ukazali da je preko 90% jedinki bilo tokom života u kontaktu sa virusom influence.
4. Primenom real-time PCR metode nije dokazan genom virusa influence kopitara u pregledanim uzorcima.
5. Sprovedenim istraživanjima registrovane su seropozitivne jedinke kod kojih je dokazano prisustvo antigena virusa influence, ali bez dokazanog prisustva genoma virusa influence.

## 8. LITERATURA

1. Abdalla M.A., Taleb Z.A., Ebid M.H.: Characterization of serum lysosomal enzymatic activities. III. Effect of infectious influenza in Egyptian equines. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 100(4):147-148, 1993.
2. Aharonson-Raz K, Davidson I, Porat Y, Altory A, Klement E, Steinman A: Seroprevalence and rate of infection of equine influenza virus (H3N8 and H7N7) and equine herpesvirus (1 and 4) in the horse population in Israel. *Journal of Equine Veterinary Science* 34: 823-832, 2014.
3. Alford R., Kasel J., Lehrich J., Knight V.: Human responses to experimental infection with influenza A/equi 2 virus. *Am J Epidemiol*, 86(1):185–192, 1967.
4. Ataseven V.S., Daly J.M.: Seroepidemiology of Equine Influenza Virus Infection in Turkey, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 31(3):199-202, 2007.
5. Back H., Berndtsson L.T., Gröndahl G., Ståhl K., Pringle J., Zohari S.: The first reported Florida clade 1 virus in the Nordic countries, isolated from a Swedish outbreak of equine influenza in 2011. *Veterinary Microbiology*, Vol. 184: 29 pp 1–6, 2016.
6. Baguelin M., Newton J.R., Demiris N., Daly J., Mumford J.A., Wood J.L.: Control of equine influenza: scenario testing using a realistic metapopulation model of spread. *Journal of the Royal Society, Interface* 7, 67–79, 2010.
7. Baker J.D.: Rationale for the use of influenza vaccines and the importance of antigenic drift. *Equine Vet J*, 18:93, 1986.
8. Barbić LJ., Madić J., Turk N., Daly J.: Vaccine failure caused an outbreak of equine influenza in Croatia. *Veterinary Microbiology* 133: 164-171, 2009.

9. Barquero N., Daly J.M., Newton J.R.: Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25, 7520–7529, 2007.
10. Binns M.M., Daly J.M., Chirnside E.D., et al. Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic. *Arch Virol*, 130:33-43, 1993.
11. Bielefeldt-Ohmann H.: Role of cytokines in the pathogenesis and treatment of respiratory disease. In: Myers, M.J., Murtaugh, M.P. (Eds.), *Cytokines in Animal Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 291-332, 1995.
12. Beech J.: Infections caused by viruses,. In Beech J (ed.): *Equine Respiratory Disorders*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 153-180, 1991.
13. Begg A.P., Reece R.L., Hum S., Townsend W., Gordond A., Carricke J.: Pathological changes in horses dying with equine influenza in Australia, 2007. *Australian Veterinary Journal* Vol. 89, Suppl. 1, 2011.
14. Beveridge W.I.B., Mahaffey L.W., Rose M.A.: Influenza in horses. *Vet Rec*, 77:57-59, 1965.
15. Boliar S., Stanislawek W., Chambers T.M.: Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine H7N7 influenza virus. *J Vet Diagn Invest*, 18:264–267, 2006.
16. Bountouri M., Fragkiadaki E., Ntafis V., Xylouri E.: Equine influenza. *Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society* 62(2): 161-171, 2011.
17. Britton A.P., Robinson J.H.: Isolation of influenza A virus from a 7-day-old foal with bronchointerstitial pneumonia. *Can. Vet. J.* 43:55–56, 2002.
18. Bryant N.A., Rash A.S., Russell C.A., Ross J., Cooke A., Bowman S., MacRae S., Lewis N.S., Paillot R., Zanoni R., Meier H., Griffiths L.A., Daly J.M., Tiwari A., Chambers T.M., Newton J.R., Elton D.M.: Antigenic and genetic variations in



- European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Veterinary Microbiology*, 138, 41–52, 2009.
19. Caerdwell J, Newton R, Wood J et al.: Equine Influenza in donkeys in the New Forest. *Vet Rec*, 147;10, 2000.
  20. Chambers T.M., Shortridge K.F., Li P.H., Powel D.G., Watkins K.L.: Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen™ Flu-A enzyme immunoassay. *Vet Rec*, 135:275-279, 1994.
  21. Chamber T.: A new test for equine influenza. *Equine Dis Q*, 2:1, 1994.
  22. Cheevers W.M., Mcguire T.C.: Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.*, 7,83–88, 1985.
  23. Chenchev I., Rusenova N., Sandev N.: Seroepidemiological studies of donkeys' blood for detection of some virus infections on ungulates *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 9, No2, pp 82-86, 2011.
  24. Chenchev I., Doumanova L., Kotseva R. et al.: Equine influenza outbreak in Bulgaria in 1989. In: *Proceedings of the Sixth International Conference*, 306, 1992.
  25. Clarke A.: A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine Vet J*, 19:435-441, 1987.
  26. Clemow F. The recent pandemic of influenza: its place of origin and mode of spread. *Lancet*, 1:139–143, 1894.
  27. Coggin L.: Viral respiratory diseases. *Vet Clin North Am (Large Animal Pract)* 1:59, 1979.
  28. Coggins, L. Equine influenza. In: *Equine Medicine and Surgery*, 4th edn. Eds: P.T. Colahan, I.G. Mayhew, A.M. Merritt and J.N. Moore. American Veterinary Publications Inc., Goleta, California. pp 380-382, 1991.

29. Couetil L.L., Hoffman A.M., Hodgson J., Buechner – Maxwell V., Viel L., Wood J.L.N., Lavoie J.P.: Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med* 21: 356-361, 2007.
30. Cole E., Cook C.: Characterization of infectious aerosols in health care facilities: an aid to effective engineering controls and preventive strategies. *Am J Infect Control* 26(4):453–464, 1998.
31. Cullinane A., Newton J.R.: Equine influenza – A global perspective. *Veterinary Microbiology* 167: 205-214, 2013.
32. Čilerdžić M., Marković M., Petrović N., Stančetić S., Tikvicki G., Trailović D.R.: Influenca konja u Srbiji 2004. godine: uzroci i posledice. *Stočarstvo, veterinarstvo i agroekonomija u tranzicionim procesima*; Herceg Novi; 2005.
33. Daly J.M., Lai A.C.K., Binns M.M., Chambers T.M., Barrandeguy M., Mumford J.A.: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 77, 661–671, 1996.
34. Daly J. M., MacRae S., Newton J.R., Wattrang E., Elton D. M.: Equine influenza: A review of an unpredictable virus. *The Veterinary Journal*, 189:7–14, 2011.
35. Daly J. M. and Mumford J. A.: Influenza infections, *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux (Ed.); International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA. 13-Nov-2001.
36. Daly J.M., Yates P.J., Browse G., Swann Z., Newton J.R., Jessett D., Davis-Poynter N., Mumford J.A.: Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift on cross-protection afforded by equine influenza vaccines. *Equine Veterinary Journal*, 35, 458–462, 2003.
37. Daly J.M., Yates P.J., Newton J.R., Park A., Henley W., Wood J.L.N., Davis-Poynter N., Mumford J.A.: Evidence supporting the inclusion of strains from each of the two

- co-circulating lineages of H3N8 equine influenza virus in vaccines. *Vaccine*, 22, 4101–4109, 2004.
38. Damiani A.M., Scicluna M.T., Ciabatti I., Cardeti G., Sala M., Vulcano G., Cordioli P., Martella V., Amaddeo D., Autorino G.L.: Genetic characterization of equine influenza viruses isolated in Italy between 1999 and 2005. *Virus Research*, 131:100–105, 2008.
39. DebRoy C., Roberts E., Jayarao B.M., Brooks J.W.: Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J Vet Diagn Invest*, 20:661–664, 2008.
40. Derksen F., Brown C., Sonea B.: Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses. *Equine Vet J*, 21:23-26, 1989.
41. Đuričić B., Samokovlija A., Ilić Ž., Bacić D., Radojičić S., Gligić A.: Seroepizootiološka ispitivanja životinja sa lokalteta Obedska bara na prisustvo virusa influence ptica. *Veterinarski Glasnik*. 64(5-6): 307-317, 2010.
42. El Idrissi A.H., Lubroth, J.: Global epidemiology of infectious diseases in working equine animals. *Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Morocco*, 185-186, 2006.
43. El-Rahim Abd I.H.A., Hussein M.: An epizootic of equine influenza in Upper Egypt in 2000. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23 (3), 921-930, 2004.
44. Feng K.H., Gonzalez G., Deng L., Yu H., Tse V.L., Huang L., Huang K., Wasik B.R., Zhou B., Wentworth D.E., Holmes E.C., Chen X., Varki A., Murcia P.R., Parrish C.R.: Equine and canine influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence. *J Virol* 89:6860–6873, 2015.
45. Fitch W.M., Bush R.M., Bender C.A., Cox N.J.: Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94, 7712–7718, 1997.

46. Foord A.J., Selleck P., Colling A., Klippel J., Middleton D., Heine H.G.: Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007 (H3N8). *Vet. Microbiol.*, 137,1–9, 2009.
47. Fougerolle S., Legrand L., Foursin M., D'Ablon X., Bayssat, P., Pronost, S. Paillot, R.: Impact of age at first immunisation on Equine influenza short and mid-term protective antibody levels in Thoroughbred foals. *Equine Veterinary Journal* 47, Suppl. 48, 2015.
48. Freidl G.S., Meijer A., de Bruin E., de Nardi M., Munoz O., Capua I., Breed A.C., Harris K., Hill A., Kosmider R., Banks J., von Dobschuetz S., Stark K., Wieland B., Stevens K., van der Werf S., Enouf V., van der Meulen K., Van Reeth K., Dauphin G., Koopmans M.: Influenza at the animal–human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Euro Surveill.* 19(18), 2014.
49. Gerber, H.: Equine influenza: clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. In: *Equine Infectious Diseases 11: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Equine Infectious Diseases* Ed: J.T. Bryans. Karger Basel, New York. pp 63-80, 1970.
50. Gerber H.: The clinical differentiation of some equine viral diseases. In: *Proceedings of the 5th BEVA Congress*, 3-16, 1966.
51. Gerber V., Baleri D., Klukowska-Rotzler J., Swinburne J.E., Dolf G.: Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 23: 626-630, 2009.
52. Gildea S., Arkins S., Cullinane A.: Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010. *Equine Veterinary Journal.* 43 (5) 608-617, 2011.

53. Gildea S., Fitzpatrick D.A., Cullinane A.: Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010–2012). *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7(Suppl 4):61–72.
54. Giguère S.: Pneumonia in Adult Horses, Proceedings of the American Association of Equine Practitioners - Focus Meeting, Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases, Salt Lake City, UT, USA, pp:38-48, 2010.
55. Glass K., Wood J.L., Mumford J.A., Jesset D., Grenfell B.T.: Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within-yard epidemics. *Epidemiology and Infection* 128, 491–502, 2002.
56. Gross D.K., Hinchcliff K.W., French P.S., et al: Effect of moderate exercise on the severity of clinical signs associated with influenza virus infection in horses. *Equine Vet J* 30:489–497, 1998.
57. Guo Y., Wang M., Kawaoka Y., et al.: Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology*, 188:245-255, 1992.
58. Guo Y., Wang M., Zhang G.S., et al.: Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993-94. *J Gen Virol*, 76:2009-2014, 1995.
59. Gupta A.K., Yadav M.P., Uppal P.K., et al.: Characterisation of equine influenza isolates from the 1987 epizootic in India by nucleotide sequencing from the HA1 gene. *Eq Vet J*, 25:99-102, 1993.
60. Haaheim L.R., Schild G.C.: Antibodies to the strain-specific and cross-reactive determinants of the haemagglutinin of influenza H3N2 viruses. Antiviral activities of the antibodies in biological systems. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 88, 335–340, 1980.
61. Hall C.B.: The spread of influenza and other respiratory viruses: complexities and conjectures. *Clin Infect Dis*, 45(3):353–359, 2007.

62. Hannant D., Mumford J.A.: Equine influenza, In: Studdert M.J., Horzinek M.C. (Ed). *Virus Infections of Equines*. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier Science, pp285-293, 1996.
63. Heinemann M.B., Cortez A., Lara M.C., Cunha E.M., Nassar A.F., Villalobos E.M., Ferreira N.J., Homem V.S., Ferreira F.: Soroprevalencia do virus da influenza equina no Municipio de Uruara, PA, Brasil, Amazonia oriental. *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo*, v.76, n.4, p.697-699, 2009.
64. Hirst G.K.: The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *Journal of Experimental Medicine* 75, 49–64, 1942.
65. Hulten C., Sandgren B., Skioldebrand E., et al: The acute phase protein serum amyloid (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand* 40:323-333, 1999.
66. Holland R.E. Jr, Tudor L.R., Timoney J.R. et al.: Equine Influenza disease in Donkeys: severe bronchopneumonia due to clonal invasion by *streptococcus zooepidemicus*. In: Proceedings of the 8th Int Conf, 1999.
67. Ito, T., Goto, H., Yamamoto, E., Tanaka, H., Takeuchi, M., Kuwayama, M., Kawaoka, Y. & Otsuki, K: Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol.* 75. p. 4439 – 4443., 2001.
68. Jaeschke G., Lange W.: Beobachtungen bei equinen Influenza-Epidemien mit viraler Antigendrift in Berlin 1988-1991. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106:119-123, 1993.
69. Jin H., Zhou H., Liu H., Chan W.H., Adhikary L., Mahmood K., Lee M.S., Kemble G., Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for antigenic drift from A/Panama/2007/99. *Virology* 336, 113–119, 2005.

70. John T.J., Fulginiti V.A.: Parainfluenza 2 virus: increase in haemagglutinin titre on treatment with Tween-80 and ether. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121, 109–111, 1966.
71. Kapoor S., Dhama K.: *Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans*, Springer International Publishing, Switzerland, 2014.
72. Kawaoka Y., Bean W. J., Webster R. G.: Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology* 169, 283–292, 1989.
73. Kawaoka Y., Chambers T.M., Sladen W.L., Webster R.G.: Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology*, 163 pp. 247–250, 1988.
74. Kawaoka Y., Webster, R. G.: Origin of the hemagglutinin on A/equine/Johannesburg/86 (H3N8): the first known outbreak of equine influenza in South Africa. *Arch Virol*, 106:159-164, 1989.
75. Kirkland P.D., Finlaison D.S., Crispe E., Aeron C. Hurt A.C.: Influenza Virus Transmission from Horses to Dogs, Australia. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 16, No. 4, 2010.
76. Knowles R.C., King, H.C.: The 1963 equine influenza epizootic. *J. Am. vet. med. Ass.* 143, 1108-1 110, 1963.
77. Kobluk C.N., Ames T.R., Geor R.J.: *The horse: Diseases and clinical management*. W.B. Saunders, 1995.
78. Krumrych W., Wisniewski E., Dabrowska J., Danek J.: Haematological parametres in the course of equine influenza. *Bull Vet Inst Pulawy*. 43,147, 1999.
79. Laabassi F., Mamache B.: Virus de la grippe equine: epidemiologie, diagnostic et vaccination. *Revue Med. Vet.*, 165: 1-2, 31-43, 2014.
80. Laabassi F., Lecouturier F., Amelot G., Gaudaire D., Mamache B., Laugier C., Legrand L., Zientara S., Hans A.: Epidemiology and Genetic Characterization of

- H3N8 Equine Influenza Virus Responsible for Clinical Disease in Algeria in 2011. *Transboundary and Emerging Diseases*. 62, 623–631, 2015.
81. Lai A.C.K., Lin Y.P., Powell D.G., et al.: Genetic and antigenic analysis of the influenza virus responsible for the 1992 Hong Kong equine influenza epizootic. *Virology* 204:673-679, 1994.
82. Lamb R.A., Krug R.M.: *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology*, Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., Straus S.E., eds., 3rd ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1353-1395, 1996.
83. Landolt G. A., Townsend H. G, Lunn P.: *Equine influenza infection in Equine infectious diseases* Ed. Sellon D. and Long M. Elsevier, 2014.
84. Larson K., Heil G., Chambers T., Capuano A., White S., Gray G.: Serological evidence of equine influenza infections among persons with horse exposure, Iowa. *Journal of Clinical Virology* 67: 78–83, 2015.
85. Laurent L., Hoffman A.M., Hodgson J., Buechner-Maxwell V.A., Viel L., Wood J.L.N., Lavoie J.P.: Inflammatory Airway Disease of Horses. *J Vet Intern Med*, 21:356-367, 2007.
86. Laus F., Attil A.R., Cerquetella M., Spaterna B., Tesse B., Cuteri V.: Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of standardbred horses with poor performances. *Vet Med – Czech* 54: 444-450, 2009.
87. Legrand L.J., Pitel P.H.Y, Marcillaud-Pitel C. J., Cullinane A. A., Couroucé A. M., Fortier G. D., Freymuth F. L., Pronost S. L.: Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Veterinary Journal*. 45, 776–783, 2013.
88. Liu I.K.M.: Equine influenza. In: *Current Therapy in Equine Medicine*. Ed: N.E. Robinson. W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania. pp 3-4, 1983.



89. Lu Z., Chambers T.M., Boliar S., Branscum A.J., Sturgill T.L., Timoney P.J., Reedy S.E., Tudor L.R., Dubovi E.J., Vickers M.L., Sells S., Balasuriya U.B.: Development and evaluation of one-step Taqman real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix and hemagglutinin genes of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 3907–3913. 2009.
90. Madić J., Martinović S., Naglič T., Hajsig D., Cvetnić S.: Serological evidence for the presence of A/equine-1 influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. *Vet Rec*, 138:68, 1996.
91. Mancini D.A., Mendonca R.M., Pereira A.S., et al.: Influenza viruses in adult dogs raised in rural and urban areas in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 54(6):311–314, 2012.
92. Mancini D.A., Pereira A.S., Mendonça R.M., Kawamoto A.H., Alves R.C., Pinto J.R., Mori E., Richtzenhain L.J., Mancini-Filho J.: Presence of respiratory viruses in equines in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(3):191-195, 2014.
93. Marinković D, Aleksić-Kovačević S, Plamenac P, 2007, Morphological findings in lung of the horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Acta Veterinaria (Beograd)*, 57(2-3):157-167.
94. Martin C.M., Kunin C.M., Gottlieb L.S., et al: Asian influenza A in Boston, 1957-1958. I. Observations in thirty-two influenza-associated fatal cases. *Arch Intern Med* 103(4):515–531, 1959.
95. Mašić A., Woldeab N., Embury-Hyatt C., Zhou Y., Babiuk S.: A single dose vaccination with an elastase-dependent H1N1 live attenuated swine influenza virus protects pigs from challenge with 2009 pandemic H1N1 virus. *Acta Veterinaria-Beograd*. 64(1): 10-23, 2014.
96. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., et al: Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78:12665–12667, 2004.

97. Mazan M.R.: Inflammatory Airway Disease in the Horse. Proceedings of the American Association of Equine Practitioners - Focus Meeting, Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases, Salt Lake City, UT, USA 2010, pp: 100-106.
98. McGorum B.S., Ellison J., Cullen R.T.: Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management system. *Equine Vet J*, 30:430-434, 1998.
99. McQueen J.L., Steele J.H., Robinson R.Q.: Influenza in animals. *Adv. Vet. Sci.* 12, 285-336, 1968.
100. Meijer A., Bosman A., van de Kamp et al.: Mesasurement of antibodies to avian influenza virus A (H7N7) in humans by hemagglutination inhibition test, *Journal of Virological Methods*, 132(1-2), 113-120, 2006.
101. Minuse E., McQueen J., Davenport F.: Studies of antibodies to 1956 and 1963 equine influenza viruses in horses and man. *J Immunol*, 94(4):563-566, 1965.
102. Miller W.C.: Equine influenza: further observations on the "coughing" outbreak. *Vet Rec* 77:455-456, 1965.
103. Morens D.M., Taubenberger J.K.: Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 4(6), 327-337, 2010.
104. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S.: The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med*, 361(3):225-229, 2009.
105. Moriguchi S., Onuma M., Goka K.: Potential risk map for avian influenza A virus invading Japan. *Divers Distrib* 19(1):78-85, 2013.
106. Morley P.S., Bogdan J.R., Townsend H.G.G., et al: Evaluation of Directigen™ Flu A assay for detection of influenza antigen in nasal secretions of horses. *Equine Vet J*, 27:131-134, 1995.

107. Myers C., Wilson W.: Equine Influenza Virus. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 5(3), 187-196, 2006.
108. Muller I., Pinto E., Santibanez M.C., Celedon M.O., Valenzuela P.D.: Isolation and characterization of the equine influenza virus causing the 2006 outbreak in Chile. *Veterinary Microbiology* 137, 172–177, 2009.
109. Mumford J.: Respiratory Viral disease. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 3rd edn. Ed: N.E. Robinson. W.B. Saunders. Philadelphia. pp 316-324, 1992.
110. Mumford J.A., Wood J.M., Folkers C., et al.: Protection against experimental infection with influenza virus A/equine /Miami/63(H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus. *Epidem Inf*, 100:501-510, 1988.
111. Mumford J.A., Hannant D., Jessett D.M.: Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet J*, 22:93-98, 1990.
112. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J.: *Veterinary Virology* 3<sup>rd</sup> ed., 459-468, Elsevier, San Diego, CA, USA, 1999.
113. Nelson K.M.: Antibody isotype responses and protective immunity resulting from equine influenza virus infection or conventional vaccination, Madison, University of Wisconsin (Master of Science thesis), 1995.
114. Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D.R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., Kawaoka Y.: Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96, 9345–9350, 1999.
115. Newton R.: What technology can teach us about equine influenza. *Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress BEVA Sep. 10 – 13, Liverpool, United Kingdom*, 189-190, 2008.

116. Newton J.R., Daly J.M., Spencer L., Mumford J.A.: Description of the equine influenza (H3N8) outbreak in the United Kingdom during 2003, during which recent vaccination failed to prevent disease in racehorses in Newmarket. *Veterinary Record*, 158,185–192, 2006.
117. Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J.: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Preventive Veterinary Medicine* 46, 129–141, 2000.
118. Newton J., Mumford J.: Equine influenza in vaccinated horses. *Vet Rec*, 495-496, 1995.
119. Newton J.R., Mumford J.A.: Equine influenza. In Coetzer JAW, Tustin RC, editors: *Infectious diseases of livestock*, Oxford, Oxford University Press, pp 766–774, 2005.
120. Newton J.R., Verheyen K., Wood J.L.N., Yates P.J., Mumford J.A.: Equine influenza in the United Kingdom in 1998. *Veterinary Record* 145,449–452, 1999.
121. OIE: Conclusions and recommendations from the consultation meeting of OIE and WHO experts on equine influenza, Newmarket, United Kingdom, September 18–19, 1995. *Bulletin of the Office International des Epizooties* 108, 482–484, 1996.
122. OIE: Conclusions and recommendations from the expert surveillance panel on equine influenza vaccines. *Bulletin of the Office International des Epizooties*, 2, 35–36, 2006.
123. OIE: *Terrestrial Manual*, Chapter 2.5.7., 2015.
124. OIE: Update on avian influenza in animals (type H5 and H7). Available from <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avianinfluenza/2011>, 2011.
125. Olusa T.A., Adegunwa A.K., Aderonmu A.A., Adeyefa C.A.: Serologic evidence of equine H7 influenza virus in polo horses in Nigeria. *Science world journal* 5: 2, 2010.

126. Ozaki H., Sugiura T., Sugita S., et al: Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction Equine influenza virus between vaccinated and infected horses. *Vet Microbiol*, 82:111-119, 2001.
127. Paillot R., Hannant D., Kydd J.H., Daly J.M.: Vaccination against equine influenza: quid novi? *Vaccine*, 24(19):4047–4061, 2006.
128. Palese P., Garcia-Sastre A.: Influenza viruses. In *Encyclopedia of Virology*, Webster R.G., Granoff A., eds.) 2nd ed., Academic Press, London, 1998.
129. Palese P., Shaw M.L.: Orthomyxoviridae: the virus and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Ed). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp.1647-1689, 2007.
130. Palić T., Resanović R.: Savremeni trendovi u uzgoju i zdravstvenoj zaštiti živine, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine i Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Uprava za veterinu, EDUVET [www.vet.bg.ac.rs/~eduvet/ee/05.pdf](http://www.vet.bg.ac.rs/~eduvet/ee/05.pdf)
131. Park A.W., Wood J.L.N., Daly J.M., Newton J.R., Glass K., Henley W., Mumford J.A., Grenfell B.T.: The effects of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271, 1547–1555, 2004.
132. Pasick J., Berhane Y., Embury-Hyatt C., Capps J., Kehler H., Handel K., Babiuk S., Hooper-McGrevy K., Li Y., Mai Le Q., Phuong S.L.: Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, No. 12, 2007.
133. Patterson-Kane J.C., Carrick J.B., Axon J.E., et al: The pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. *Equine Vet J* 40:199–203, 2008.

134. Peek S.F., Landolt G., Karasin A.I., et al: Acute respiratory distress syndrome and fatal interstitial pneumonia associated with equine influenza in an neonatal foal. *J Vet Intern Med* 18:132–134, 2004.
135. Perglione C.O., Gildea S., Rimondi A., Mino S., Vissani A., Carossino M., Cullinane A., Barrandeguya M.: Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10(1), 37–46, 2016.
136. Powell D.G., Watkins K.L., Li P.H., et al.: Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992. *Vet Rec*, 136:531-536, 1995.
137. Powell, D.G.: Viral respiratory disease of the horse. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 2nd edn. Eds: N.E. Robinson and F.J. Derksen. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 581-590, 1987.
138. Powell, D.G.: Viral respiratory disease of the horse. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.* 7, 27-52, 1991.
139. Pravilnik o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2013. godinu. [http://www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs/sites/default/files/pravilnik\\_zastita\\_zivotinja.pdf](http://www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs/sites/default/files/pravilnik_zastita_zivotinja.pdf), 2013.
140. Probst C.P., König J., Gethmann D., Höreth-Böntgen C., Staubach F.J., Conraths M.: Kramer Ansteckende Blutarmut der Einhufer, *Deutsches Tierärzteblatt* 12,1598-1605, 2010.
141. Qi T., Guo W., Huang W., Dai L., Zhao L., Li H., Li X., Zhang X., Wang Y., Yan Y., He N., Xiang W.: Isolation and genetic characterization of H3N8 equine influenza virus from donkeys in China. *Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.006., 2010.
142. Quinlivan M., Cullinane A., Nelly M., et al: Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 42:759- 763, 2004.

143. Quinlivan M., Zamarin D., Garcia-Sastre A., Cullinane A., Chambers T., Palese P.: Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *Journal of Virology*, 79, 8431–8439, 2005.
144. Reeth K.V.: Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology* 74, 109-116, 2000.
145. Robinson N.E.: Equine COPD, Heaves, RAO, IAD: Understanding the phenotypes of equine airway disease. Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference Oct. 17-19, Barcelona, Spain, 2008.
146. Robinson N.E.: Recurrent Airway Obstruction (Heaves). In: Lekeux P: *Equine Respiratory Diseases* (ed), International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2001.
147. Robinson N.E., Derksen F.J., Olszewski M.A., Buechner-Maxwell V.A.: The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Brit Vet J*, 152(3):283-306, 1996.
148. Rose M.A., Round M.C., Beveridge W.I.B.: Influenza in horses and donkeys in Britain. *Vet Rec*, 86:768-769, 1970.
149. Rozek W., Purzycka M., Polak M.P., Gradzki Z., Zmudzinski J.F.: Genetic typing of equine influenza virus isolated in Poland in 2005 and 2006. *Virus Research* 145, 121–126, 2009.
150. Sajid M., Ahmad M.D., Khan M.A., Anjum M.A., Mushtaq M.H.: Investigation of equine influenza virus in two geographical regions of Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*. 45(2): 693-4, 2012.
151. Savić B., Radanović O., Jovičić D., Nešić K., Ivanović S., Stevančević O., Cvetojević Đ., Kasagić D.: Survey of infectious agents associated with porcine respiratory disease complex (PRDC) in Serbian swine herds using polymerase chain reaction (PCR) detection. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 65 (1): 79-88, 2015.

152. Siengsan-an-Lamont J., Robertson I., Blacksell S.D., et al.: Virological and molecular epidemiological investigations into the role of wild birds in the epidemiology of influenza A/H5N1 in central Thailand. *Vet Microbiol* 148:213–218, 2011.
153. Slemons R.D., Johnson D.C., Osborn J.S., Hayes F.: Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis.*, 18, pp. 119–12, 1974.
154. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M.: Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 305, 371–376, 2004.
155. Solórzano A., Foni E., Córdoba L., Baratelli M., Razzuoli E., Bilato D., Martín del Burgo M.A., Perlin D.S., Martínez J., Martínez-Orellana P., Fraile L., Chiapponi C., Amadori M., del Real G., Montoya M.: Cross-species infectivity of H3N8 influenza virus in an experimental infection in swine. *J Virol* 89:11190–11202, 2015.
156. Sovinova O., Tumova B., Poutska F., Nemeč J.: Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 2(1):52–61, 1958.
157. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L.: Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutination subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3256-3260, 2002.
158. Starick E., Beer M., Hoffmann B., et al.: Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. *Vet Microbiol* 128:243–252, 2008.
159. Sugiura T., Sugita S., Imagawa H., et al: Serological diagnosis of equine influenza using hemagglutinin protein produced in a baculovirus expression system. *J Virol Methods*, 98:1-8, 2001.
160. Swayne D.E., King D.J.: Avian influenza and newcastle disease. *J Am Vet Med Assoc* 222:1534–1540, 2003.



161. Swofford D.L.: PAUP\* 4.0: Phylogenetic Analysis using Parsimony (\*and other methods). In. Sinauer Associates, 1999.
162. Šekler M., Ašanin R., Krnjajić D., Palić T., Milić N., Jovanović T., Kovačević D., Plavšić B., Stojanović D., Vidanović D., Ašanin D. Examination of presence of specific antibodies against avian Influenza virus in some species of wild birds. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 59(4): 381-403, 2009.
163. Taubenberger J.K., Morens D.M.: Pandemic influenza – including a risk assessment of H5N1. *Rev Sci Tech*, 28(1):187–202, 2009.
164. Tellier R.: Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis* 12(11):1657–1662, 2006.
165. Thiemann A.K.: Respiratory disease in the donkey. *Equine veterinary education* 24(9) 469-478, 2012.
166. Thiemann A.K., Bell N.J.: The peculiarities of donkey respiratory disease, equine respiratory diseases, P. Lekeux (Ed.), Publisher: International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA. 2001.
167. Tong S., Li Y., Rivaille P. et al.: A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:4269–4274, 2012.
168. Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L. M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C. T., Paulson, J. C., Stevens, J., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C., Wilson, I. A., Donis, R. O.: New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*. 9 (10). 2013.
169. Townsend H.G.C., Morley P.S., Newton J.R., Wood J.L.N., Haines D.M., Mumford J.A.: Measuring serum antibody as a method of predicting infection and disease in horses during outbreaks of influenza. *Proceeding of the Eighth International Conference, Dubai*. pp 33-7, 1997.
170. Trailović D.R.: *Bolesti kopitara*, Naučna KMD, Beograd, 2011.

171. Trailović D.R.: Respiratorne bolesti konja. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2000.
172. Tu J., Zhou H., Jiang T., Li C., Zhang A., Guo X., Zou W., Chen H., Jin M.: Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza virus from pigs in China. *Arch. Virol.*, 154, 887–890, 2009.
173. Van Maanen C., Cullinane A.: Equine influenza virus infections: an up - date. *Vet Q* 24:79-94, 2002.
174. Van Reeth K.: Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology* 74, 109–116, 2000.
175. Vasković N., Šekler M., Vidanović D., Polaček V., Kukolj V., Matović K., Jovanović M.: Pathomorphological lesions and distributions of viral antigens in birds infected with the pathogenic strain of H5N1 avian influenza virus. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 61(5-6): 591-598, 2011.
176. Virmani N., Bera B.C., Singh B.K., Shanmugasundaram K., Gulati B.R., Barua S., Vaid R.K., Gupta A.K., Singh R.K.: Equine influenza outbreak in India (2008–09): virus isolation, sero-epidemiology and phylogenetic analysis of HA gene. *Veterinary Microbiology*. 143: 224-237, 2010.
177. Wallace L.A., Collins T.C., Douglas J.D., McIntyre S., Millar J., Carman, W.F.: Virological surveillance of influenza-like illness in the community using PCR and serology. *Journal of clinical virology*. 31(1): 40-45, 2004.
178. Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M.: A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J Am Vet Med Assoc*, 143:587–590, 1963.
179. Watrang E., Jessett D.M., Yates P., Fuxler L., Hannant D.: Experimental infection of ponies with equine influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses. *Viral Immunology* 16, 57–67, 2003.

180. Weber TP, Stilianakis NI (2008) Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. *J Infect* 57(5):361–373
181. Webster W.R.: Overview of the 2007 Australian outbreak of equine influenza. *Australian veterinary journal* 89(1)3-4, 2011.
182. Willoughby R., Ecker G., McKee S., et al.: The effects of equine rhinovirus, influenza virus and herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses. *Can J Vet Res* 56:115-121, 1992.
183. Wilson I.A., Cox N.J.: Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annual Review of Immunology* 8, 737–771, 1990.
184. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C.: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366–373, 1981.
185. Winder N.C., Grunig G., Hermann M.: Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with histologically diagnosed pulmonary disease. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1991, 133: 123-130, 1991.
186. Wood J.M., Gaines-Das R.E., Taylor J., et al.: Comparison of influenza serological techniques inter-national collaborative study. *Vaccine* 12:167-174, 1994.
187. Wright P.F., Neumann G., Kawaoka Y.: Orthomyxoviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1691–1740, 2007.
188. Wysocka B., Kluciński W.: Usefulness of the assessment of discharge accumulation in the lower airways and tracheal septum thickening in the differential diagnosis of recurrent airway obstruction (RAO) and inflammatory airway disease (IAD) in the horse. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 17, No. 2 247–253, 2014.

189. Yamanaka T., Niwa H., Tsujimura K., Kondo T., Matsumura T.: Epidemic of Equine Influenza among Vaccinated Racehorses in Japan in 2007. *J. Vet. Med. Sci.* 70(6): 623–625, 2008.

## 9. Biografija

Rođen 10.11.1982. godine u Zrenjaninu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju.

Osnovne studije upisao akademske 2001/2002 godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, na smeru veterinarske medicine, a završio iste 14.11.2006. sa prosečnom ocenom 9,21 i stekao zvanje diplomirani veterinar. Tokom osnovnih studija bio proglašen za najboljeg studenta pete godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

Na diplomskim akademskim master studijama, na Poljoprivrednom fakulteta u Novom Sadu, smer veterinarska medicina, diplomirao 14.02.2008. sa prosečnom ocenom 9,67 i ocenom na odbrani diplomskog rada - master 10, i stekao zvanje doktor veterinarske medicine. Tema diplomskog rada je bila: "Indukcija i sinhronizacija estrusa kod tovnih rasa goveda".

Bio stipendista "Fonda za stipendiranje talentovanih studenata", Vlade Republike Srbije.

Tokom master studija, kao stipendista Ministarstva nauke, bio je angažovan na projektu Ministarstva nauke: "Definisanje savremene tehnologije proizvodnje i reproduktivne eksploatacije priplodnih nazimica". Takođe je bio učesnik projekta Ministarstva nauke: "Unapređenje mikrobiološke bezbednosti sirovog goveđeg mesa, ocena izloženosti potrošača za E. coli O157:H7 i Salmonella spp." a trenutno je angažovan na projektu: "Unapređenje zdravlja i dobrobiti visokoproduktivnih krava identifikacijom i otklanjanjem stresogenih faktora".

Po završetku osnovnih studija, od akademske 2006/2007, kao postdiplomac, zadužen je za izvođenje vežbi i pomaganje u izvođenju teoretske nastave na predmetu: Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja. A od akademske 2008/2009 angažovan je na predmetima: Bolesti kopitara, zatim na delu predmeta Opšta klinička dijagnosti koji se odnosi na kopitare, Reprodukcija i veštačko osemenjavanje, kao i na predmetu Porodiljstvo i sterilitet.

Aprila 2009. godine izabran je u zvanje asistenta na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Aktivno se služi engleskim jezikom a pasivno nemačkim. Takođe vlada osnovnim veštinama rada na računaru u "Windows" okruženju i programima iz paketa "Office".

Član je Veterinarske komore, broj licence 3388 i Srpskog veterinarskog društva.

Koautor je jednog pomoćnog udžbenika - praktikuma, a takođe je bio autor ili koautor u izradi više od 85 naučnih radova i saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima i sa indeksom kompetentnosti preko 125.

Oženjen Gordanom, otac jednog deteta, sina Mateje.