DIJAGNOSTIKA HERPESVIRUSNE INFEKCIJE U PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ I NJEZIN UTJECAJ NA POREMEĆAJE REPRODUKCIJE

Gracin, Koraljka

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:119220

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Koraljka Gracin

DIJAGNOSTIKA HERPESVIRUSNE INFEKCIJE U PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ I NJEZIN UTJECAJ NA POREMEĆAJE REPRODUKCIJE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Koraljka Gracin

DIAGNOSTICS OF CANINE HERPESVIRUS INFECTION IN REPUBLIC OF CROATIA AND THE INFLUENCE ON THE REPRODUCTIVE DISORDERS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Koraljka Gracin

DIJAGNOSTIKA HERPESVIRUSNE INFEKCIJE U PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ I NJEZIN UTJECAJ NA POREMEĆAJE REPRODUKCIJE

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
Izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Koraljka Gracin

DIAGNOSTICS OF CANINE HERPESVIRUS INFECTION IN REPUBLIC OF CROATIA AND THE INFLUENCE ON THE REPRODUCTIVE DISORDERS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Asst. Prof. Vladimir Stevanović
Assoc. Prof. Martina Lojkić

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

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

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2020.

ZAHVALE

Zahvaljujem Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na sveobuhvatnoj potpori prilikom izrade doktorskog rada, posebno prof. dr. sc. Vilimu Starešini na dozvoli izrade laboratorijskog dijela u Virološkom laboratoriju.

Zahvaljujem se mentorima doc. dr.sc. Vladimiru Stevanoviću i izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić na vodstvu i stručnoj pomoći.

Također zahvaljujem djelatnicama Virološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, voditelju prof. dr. sc. Ljubi Barbiću na vrijednim savjetima te dr. sc. Snježani Kovač i Kristini Kovač za bezgraničnu strpljivost i stručnost prilikom izvođenja laboratorijskog dijela.

Posebno hvala doc. dr. sc. Maji Maurić na statističkoj obradi rezultata.

Također hvala i svima koji su pomogli u sakupljanju, transportu i sortiranju velikog broja uzoraka.

Zahvaljujem svim uzgajivačima na dobroj volji i mogućnosti dobivanja niza vrijednih podataka, na mogućnosti uzorkovanja i praćenja zdravstvenog statusa pasa u njihovim uzgojima. Na kraju, hvala svim psima na strpljenju prilikom uzorkovanja i ultrazvučnih pretraga kao i na toleranciji kuja prilikom okota.

SAŽETAK

Pseći herpesvirus-1 (CaHV-1) enzootski je prisutan u pasa širom svijeta i često se navodi kao značajan uzrok uginuća štenadi, pobačaja i drugih reproduktivnih poremetnji. Do danas ne postoji opće prihvaćena metoda koja bi služila kao zlatni standard u dijagnostici infekcije CaHV-1. Također, do danas u Republici Hrvatskoj nije provedeno sustavno istraživanje seroprevalencije i epizootiologije CaHV-1 niti su rađene poveznice s reproduktivnim poremetnjama u kuja.

Cilj ovog rada bio je pronaći optimalnu metodu serološke dijagnostike infekcije pasa s CaHV-1, njezin značaj i proširenost na području Republike Hrvatske. Također, cilj rada bio je dobiti uvid u epizootiološke značajke ove infekcije. Podaci prikupljeni za potrebe ovog istraživanja iskorišteni su za ispitivanje utjecaja izloženosti kuja CaHV-1 i povezanosti s poremetnjama u reprodukciji, tijekom i ishodom gravidnosti i okota. Kao dodatni dio ovog istraživanja, pokušalo se dati odgovor o učinkovitosti imunoprofilakse u suzbijanju infekcije CaHV-1.

Seroprevalencija CaHV-1 u uzgajivačnicama, određena virus neutralizacijskim testom, iznosila je 32,02% i 30% određena imunoenzimnim testom. Statistička analiza pokazala je da se CaHV-1 u uzgajivačnicama širi i horizontalnim prijenosom u kuja i unosom uzročnika u uzgoj nakon parenja muških životinja. Kritični čimbenici u epizootiologiji infekcije CaHV-1 su: veličina uzgoja, sudjelovanje na izložbama, lov i provođenje dnevne dezinfekcije. Međutim, serološki status kuje nema značajan utjecaj na pojavu reproduktivnih problema, na način okota kuje, niti na broj štenadi prilikom okota. Serološki status kuje ne utječe na točnost predviđanja dana okota (putem pada vrijednosti serumskog progesterona, rektalne temparature niti na fetometrijska mjerenja). Također, nije utvrđen stadij spolnog ciklusa u kojem je statistički značajno veći broj seropozitivnih kuja. Od 40 cijepljenih kuja, 52,50% životinja nije serokonvertiralo, na što značajno utječe da li je kuja cijepljena u ambulanti ili izvan nje.

Visoka seroprevalencija CaHV-1 u Republici Hrvatskoj je očekivana. Znanstveni doprinos ovog rada je u određivanju optimalnog postupka izvođenja VNT koji ima veću osjetljivost od postupaka koji su ranije opisivani u literaturi. Analizom čimbenika rizika vidljivo je da za suzbijanje infekcije CaHV-1 je potrebno držanje kuja u uzgajivačnicama u manjim skupinama i provođenje mjera opće profilakse koje spriječavaju horizontalno širenje infekcije. Za rasplodne mužjake najbitnija profilaktička mjera je spriječavanje zaražavanja

prilikom parenja. Rezultati su pokazali da imunoprofilaksa nije uvijek učinkovita i da se edukacijom uzgajivača osobito treba utjecati na suzbijanje prakse da se životinje cijepe od strane nestručnih osoba.

Ključne riječi: pseći herpesvirus-1, serološka i molekularna dijagnostika, čimbenici rizika, reproduktivne poremetnje

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION

Canid alphaherpesvirus-1 (CaHV-1) is enzootic pathogen of the dogs often related to abortions, neonatal mortality and other reproductive disorders. Unfortunately, until today there is no generally accepted method that would serve as a golden standard in diagnostics of CaHV-1 which makes control of the disease very difficult. Also, to date there were no researches on CaHV-1 seroprevalence and epizootiology in Republic of Croatia and the influence on the reproductive disorders has not been investigated.

The aim of this study was to determine optimal serological method which could give the most realible results in diagnostics of CaHV-1. Also, the aim was to detemine seroprevalence in Republic of Croatia and risk factors which could influence a seroprevalence, CaHV-1 antibody titre in breeding kennels and excretion of the virus in latently infected animals. Statistical analysis and modelling was used to give insights in possible influence of CaHV-1 infection in dams on reproductive disorders. Comparison of seropositive and seronegative dams in the last 48 hours before whelping was aimed to find the influence of seropositivity on the physiology and pathology of whelping and on the number of the live puppies.

METHODS

In the period from 2014 to 2017 a total of 136 breeding bitches and 67 stud dogs, with no history of vaccination, were randomly sampled from 26 different breeding kennels in Croatia. From each animal multiple sera samples, nasal, vaginal and preputial swabs were collected. For the purpose of statistical analysis data regarding kennel size, attendance at dog shows and hunt trials, daily disinfection protocol, gender, age, breed, number of mattings and a stage of estrus cycle in dams were collected. In bitches, additional sera samples were collected in different stages of oestrus cycle and in 13 dams from one breeding kennel with reproductive problems late stage of the pregnacy was followed using ultasound and X-rays. Also, serum progesterone and rectal temperature values was mesured in last 48 hours before whelping. A type of whelping and number of alive and stillborn puppies was followed. All data were compared with a serological status of the dam.

Especially for this trial, three methods of virus neutralisation assay (VNT) were introduced and 135 sera samples were compared. Also, 89 sera samples were tested with ELISA method, using commercially available kit.

In addition to original study plan sera samples of 40 bitches vaccinated against CaHV-1 were collected in order to examine efficiency of the vaccination protocol. Data regarding vaccination date, number of vaccinations and veterinary organisation where vaccinations took place were collected and analysed.

RESULTS

Overall seroprevalence of CaHV-1 in 203 breeding dogs in Croatia using VNT was 32,02% and usine ELISA was 30%. Of the three methods of VNT (using native serum, heat inactivated serum and heat inactivated serum samples with addition of complement) the highest sensitivity was achieved using the native serum samples. Results of the VNT were compared with ELISA with a low correlation between tests. Excretion and shedding of the virus using molecular methods was not proven.

Statistical analysis showed that CaHV-1 in breeding kennels spreads and establishes enzootic cycle in two ways. In dams CaHV-1 is introduced trough infections at dog shows and later is spread horizontally in kennel. In the breeding males infection is the most often acquired during mating. In both genders, hunt was very important activity for seroprevalence and a maintance of the present antibody titre. Critical risk factors in epizootiology of the CaHV-1 infection in the breeding kennels were: a kennel size, attendance at dog shows, attendance at hunt and kennel disinfection protocols.

There was no significant influence of the oestrus cycle on the serological status of the dams. Pregnancy and lactation did not affect seroprevalence or the level of CaHV-1 antibody titres. Also, correlation of the serological status of the dam and reproductive problems, type of whelping (cesarean section or a natural whelping) or number of live, dead and on the total number of born puppies and prediction of the whelping date (via progesterone, rectal temperature and fetometry measurements) could not be established.

As additional part of this study, seroconversion in 40 vaccinated dams was followed. Of all vaccinated dams, a significant number (52,50%) of the dams did not seroconvert.

CONCLUSIONS

A high seroprevalence of CaHV-1 in Republic of Croatia was expected and it was in a line with a published results in other countries. Important scientific impact of this study is optimisation of the VNT procedure which showed that using native seras has stronger sensitivity than other methods described in literature and it is a method of choice in serological diagnostics of CaHV-1.

In analysis of the risk factors it is shown that two aproaches are needed in prophylaxis of CaHV-1 infection. In dams is very important to make a smaller groups in kennels and to use daily cleaning which can stop spreding of the disease. For the stud dogs the most important prophylactic measure is prevent infection during mating. Unfortuntaly, datas from this work has shown that specific immunoprophylactic measures are not always efective. Also, education of the dog breeders is necessary to point out that veterinary pactitioners should do the vaccination.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 4

2.1. Povijest i zemljopisna proširenost 5

2.2. Etiologija 7

2.2.1. Tenacitet CaHV-1 9

2.3. Epizootiologija 9

2.3.1. Čimbenici rizika 10

2.4. Patogeneza 11

2.5. Klinička slika 13

2.6. Razudbeni nalaz 15

2.7. Dijagnostika 16

2.7.1. Dokaz uzročnika 16

2.7.1.1. Dokaz nukleinske kiseline 16

2.7.1.2. Izdvajanje CaHV-1 na kulturi stanica 17

2.7.1.4. Dokaz antigena imunološkim metodama i serološke metode za otkrivanje specifičnih protutijela 18

2.8. Liječenje 19

2.9. Prevencija 21

2.10. Fiziologija reprodukcije kuje, reproduktivni poremećaji i uzroci uginuća štenadi 23

2.10.1. Spolni ciklus kuja 23

2.10.2. Skotnost 25

2.10.3. Određivanje termina okota 27

2.10.4. Okot kuje 31

2.10.5. Teški okot (distocija) 32

2.10.6. Uzroci uginuća štenadi u perinatalnom i neonatalnom razdoblju 32

3. OBRAZLOŽENJE TEME 35

4. MATERIJALI I METODE 37

4.1. Plan istraživanja i plan uzorkovanja 38

4.2. Epizootiološki podaci 39

4.2.1. Epizootiološki upitnik - podaci na razini uzgajivačnice 39

4.2.2. Epizootiološki upitnik - podaci na razini jedinke 40
4.3. Načini uzorkovanja i pohrane uzoraka 40
4.3.1. Serumi 40
4.3.2. Obrisci sluznica 41
4.3.3. Ostali uzorci 41
4.3.4. Izrada razmaza brisa rodnice 41
4.4. Metoda određivanja razine progesterona u serumu 42
4.4.1. Osnovni principi metode određivanja razine progesterona (ELFA) ... 43
4.4.2. Kalibracija Mini VIDAS aparata za korištenje ″VIDAS® Progesterone″ testa 44
4.5. Serološke metode 45
4.5.1. Imunoenzimni test **(**ELISA) 45
4.5.2. Virus neutralizacijski test (VNT) 49
4.5.2.1. Umnažanje stanica linijske stanične kulture MDCK 50
4.5.2.2. Umnažanje CaHV-1 na staničnoj kulturi 51
4.5.2.3. Priprema stanica linijske stanične kulture MDCK za izvođenje VNT 51
4.5.2.4. Određivanja optimalnog broja MDCK stanica za izvođenje VNT 52
4.5.2.5. Određivanje titra CaHV-1 virusa 53
4.5.2.6. Interpretacija rezultata 54
4.5.2.7. Izvođenje VN-testa 56
4.6. Molekularne metode 60
4.6.1. Izdvajanje DNK 60
4.6.1.1. Izvođenje postupka izdvajanja DNK iz uzoraka briseva sluznice nosa, rodnice i prepucija 60
4.6.1.2. Izvođenje postupka izdvajanja DNK iz organa štenadi i tkiva posteljice 62
4.6.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 64
4.6.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR metoda) u kojoj se umnaža dio gena za timidin kinazu 64
4.6.2.2. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom prema

metodi ugniježđene PCR 67
4.6.3. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu ……...69
4.7. Praćenje kasne faze gravidnosti i okota kuja 70
4.8. Statistička obrada rezultata 72
5. REZULTATI 74
5.1. Populacija pasa 75
5.1.1. Prikupljeni podaci na razini uzgajivačnice 75
5.1.2. Prikupljeni podaci na razini jedinke 76
5.1.3. Prikupljeni uzorci 76
5.1.4. Praćenje skotnosti 77
5.2. Rezultati seroloških pretraga 78
5.2.1. Rezultati imunoenzimnog testa i interpretacija rezultata 78
5.2.2. Optimatizacija VNT 79
5.2.2.1. Određivanje optimalne gustoće stanica 79
5.2.2.2. Određivanje optimalne koncentracije virusa u radnoj otopini 80
5.2.2.3. Utjecaj toplinske inaktivacije i dodatka komplementa zamorčića na rezultate ispitivanja 80
5.2.3. Usporedba rezultata ELISA i VNT 84
5.2.3. Rezultati pretrage uzoraka seruma virus neutralizacijskim testom 92
5.2.3.1. Čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalaenciju CaHV-1 92
5.2.3.2. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 100
5.2.3.3. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja 106
5.2.3.4. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u kuja 109
5.2.3.5. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka 110
5.2.3.6. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka 113
5.2.3.7. Dodatna statistička analiza dobivenih podataka 115
5.2.3.8. Utjecaj faze ciklusa, graviditeta i laktacije na seroprevalenciju kuja te povezanost seroprevalencije sa reproduktivnim

poremetnjama 127
5.2.3.9. Serokonverzija 133
5.2.3.10. Cijepljenje 134
5.3. Rezultati molekularnih metoda 136
5.3.1. Rezultati metoda lančane reakcije polimerazom 136
5.4. Rezultati praćenja kasne faze skotnosti i okota 138
5.4.1. Praćene skotnosti u odnosu na serološki status skotnih kuja 138
5.4.2. Praćenje razine progesterona i rektalne temperature 140
5.4.3. Ultrazvučno i rentgenološko praćenje kasne faze gravidnosti 142
6. RASPRAVA 146
7. ZAKLJUČCI 167
8. POPIS LITERATURE 169
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA 198

POPIS KRATICA

BPD = biparijetalni dijametar (eng. biparietal diameter)

CaHV-1 = Pseći herpesvirus-1 (eng. Canine alphaherpesvirus 1)

Ca2+ = kalcij

CPU – citopatogeni učinak

CRL = duljina između vrha glave i korijena repa (eng. crown rump length)

CLIA = Kemiluminiscentna mikročestična imunokemijska metoda (engl. chemiluminescent microparticle immunoassay)

DMSO = dimetil-sulfoksid

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

EHV-1 = konjski herpesvirus tip 1 (engl. Equid alphaherpesvirus 1)

EHV-4 = konjski herpesvirus tip 4 (engl. Equid alphaherpesvirus 4)

ELFA = imunoenzimski test s fluorescentnom detekcijom (eng. enzyme lynked fluorescent assay)

ELISA = imunoenzimni test (engl. Enzyme Linked Immunoassay)

FHV-1= mačji herpesvirus tip 1 (engl. Felid alphaherpesvirus 1)

FTS = fetalni telećI serum

ICC = unutarnji dijametar korionske šupljine (eng. diameter of the inner chorionic cavity)

IIF = indirektna imunofluorescencija

IHA = inhibicija hemaglutinacije

LH = luteinizirajući hormon

MDCK = stanična kultura bubrega psa (engl. Madine Darby Canine Kidney)

MEM = minimalni esencijalni medij

Mg2+ = magnezij

mm = milimetar

NC = negativna kontrola (engl. negative control)

nm = nanometar

PC = pozitivna kontrola (engl. positive control)

PCR = lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)

$PGF_{2\alpha}$ = prostaglandin F2 alfa

PhoHV-1 = herpesvirus foke tip 1 (engl. Phocid alphaherpesvirus 1)

RH = Republika Hrvatska

RIA = radioimunološka metoda (eng. radio immuno assay)

SVD = standardna virusna doza

SAD = Sjedinjene Američke Države

$TCID_{50}$ = polovična infekcijska doza (eng. tissue culture infective dose)

VNT = virus neutralizacijski test (engl. Virus Neutralization Assay)

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Građa herpesvirusa
Slika 2. Patogeneza CaHV-1 infekcije
Slika 3. Hormonalne promjene tijekom gravidnosti u kuje
Slika 4. Brojenje neobojenih (živih) stanica na Bürker-Türkovoj komorici
Slika 5. Shema plitice za izvođenje titracije virusa
Slika 6. Shema kontrolne (prve) plitice za izvođenje VNT
Slika 7. Shema plitice za izvođenje VNT

Tablica 1. Izračunavanje optimalnog razrijeđenja virusa za pripremanje standardne virusne doze (SVD)
Tablica 2. Tablični prikaz sakupljenih uzoraka seruma i obriska
Tablica 3. ELISA ploča – rezultati. Pozitivna kontrola nalazi se na mjestima B1 i B2, negativna kontrola na mjestima A1 i A2 i slijepa proba na mjestina C1 i C2
Tablica 4. Izdvojene vrijednosti izmjerene optičke gustoće (OD) pozitivne i negativne kontrole
Tablica 5. Prikaz određivanja optimalne koncentracije virusa u radnoj otopini
Tablica 6. Usporedba titra protutijela dobivenih s tri različite metode (pretragom nativnog seruma, pretragom inaktiviranog seruma i pretragom inaktiviranog seruma s dodatkom komplementa) i rezultata dobivenih ELISA metodom
Tablica 7. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma, uz uvjet da je granični titar VNT nula
Tablica 8. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:2
Tablica 9. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:4
Tablica 10. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:6
Tablica 11. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:8
Tablica 12. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:16
Tablica 13. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT nula

Tablica 14. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:2
Tablica 15. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:4
Tablica 16. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:6
Tablica 17. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom, granični titar VNT je 1:8
Tablica 18. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom, granični titar VNT je 1:16
Tablica 19. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s inaktiviranim uzorcima seruma, granični titar VNT je 1:2
Tablica 20. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s inaktiviranim uzorcima seruma s dodatkom seruma zamorčića uz granični titar VNT 1:2
Tablica 21. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa
Tablica 22. Utjecaj dobi na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa. Prvi rezultat χ^2 testa odnosi se na sve dobne skupine (p=0,16), drugi rezultat se odnosi na skupinu pasa ≤10 godina starosti (p=0,2).
Tablica 23. Utjecaj pasmine na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa
Tablica 24. Utjecaj uzgajivačnice na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa
Tablica 25. Odnos broja seropozitivnih jedinki između uzgajivačnica labrador retievera
Tablica 26. Istraživani čimbenici rizika i visina titra CaHV-1 u svih pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 27. Dob i visina titra protutijela za CaHV-1 u svih pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 28. Visina titra protutijela za CaHV-1 i pasmina pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 29. Visina titra CaHV-1 protutijela u uzgajivačnicama. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 30. Visina titra protutijela u uzgajivčnicama labrador retrievera. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (X ± SD)
Tablica 31. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja
Tablica 32. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom da li su parene

Tablica 33. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na broj parenja
Tablica 34. Istraživani čimbenici rizika i visina titra CaHV-1 u kuja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 35. Odnos visine titra protutijela kuja s obzirom da li su parene
Tablica 36. Odnos visine titra protutijela kuja s obzirom na broj parenja
Tablica 37. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 38. Utjecaj broja parenja na seroprevalenciju mužjaka
Tablica 39. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD).
Tablica 40. Visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka ovisno o broju parenja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD).
Tablica 41. Prikaz utjecaja (značajnost) istraživanih čimbenika rizika na seroprevalenciju i visina titra protutijela u ukupnom broju pasa, kod kuja i mužjaka
Tablica 42. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog njihovog mogućeg utjecaja na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa
Tablica 43. Visina titra protutijela za CaHV-1 nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika
Tablica 44. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog mogućeg prikrivanja utjecaja drugih čimbenika na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja
Tablica 45. Visina titra protutijela za CaHV-1 u kuja nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 46. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog njihovog mogućeg utjecaja na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka
Tablica 47. Visina titra CaHV-1 u mužjaka nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 48. Logistička regresija za sve pse - seroprevalencija
Tablica 49. Logistička regresija za kuje – seroprevalencija
Tablica 50. Logistička regresija za mužjake
Tablica 51. Utjecaj faze spolnog ciklusa na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja

Tablica 52. Odnos seropozitivnosti u pojedinoj fazi ciklusa kuje (anestrus, proestrus, estrus i diestrus) u odnosu na seropozitivnost u ostalim fazama ciklusa
Tablica 53. Utjecaj gravidnosti i laktacije na seroprevalenciju u kuja
Tablica 54. Utjecaj faze spolnog ciklusa na visinu titra CaHV-1 u kuja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 55. Usporedba visine titra protutijela u pojedinoj fazi spolnog ciklusa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 56. Prikaz utjecaja gravidnosti i laktacije na srednju vrijednost titra protutijela kod kuja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)
Tablica 57. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na pojavu reproduktivnih problema. Rezultati su prikazani kao cijeli brojevi (n) i kao postotak (%)
Tablica 58. Odnos pojave uginuća štenadi, malog broja štenadi, patološki promijenjenih plodova i nemogućnost koncepacije kuja sa serološkim statusom kuje. Rezultati su prikazani kao broj kuja (n) i kao postotak (%) od ukupnog broja kuja sa reproduktivnim problemima
Tablica 59. Prikaz odnosa seropozitivnosti cijepljenih kuja protiv CaHV-1 i utjecaj na seropozitivnost s obzirom da li je kuja cijepljena u veterinarskoj ambulanti ili izvan ambulante
Tablica 60. Prikaz uzoraka koji su ponovljeni metodom ugnježđene lančane reakcije polimerazom (ugnježđena PCR)
Tablica 61. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na način okota. Rezultati su prikazani kao cijeli brojevi (n) i kao postotak (%)
Tablica 62. Ukupan broj štenadi, broj žive i uginule štenadi u odnosu na seropozitivnost kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)
Tablica 63. Prikaz brzine pada razine serumskog progesterona zadnja dva dana pred okot s obzirom na serološki status kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)
Tablica 64. Usporedba ukupnih vrijednosti brzine pada rektalne temperature pred okot, najniže rektalne temperature pred okot te razlike prosječne i najniže rektalne temperature pred okot i usporedba dobivenih podataka sa serološkim statusom kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)
Tablica 65. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem unutarnjeg promjera korionske šupljine između 32. i 18. dana do okota

Tablica 66. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem unutarnjeg promjera korionske šupljine između 32. i 25. dana do okota
Tablica 67. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti između osam dana i dana okota.
Tablica 68. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti u periodu osam do tri dana pred okot
Tablica 69. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti u periodu od dva dana do dana okota

1. **UVOD**

Pseći heresvirus-1 (*eng. Canid alphaherpesvirus 1*, CaHV-1) je virus iz roda *Herpesvirales*, porodice *Herpesviridae*, podporodica *Alphaherpesvirine*, rod *Varicellovirus.* Proširen je širom svijeta, a novija istraživanja ukazuju na visoku prevalenciju i činjenicu da je CaHV-1 udomaćen patogen u populaciji pasa u Europi. U odraslih pasa CaHV-1 uzrokuje blago oboljenje dišnog sustava, međutim, s kliničkog i uzgojnog stanovišta značajniji su poremećaji plodnosti kuja i smrtnost štenadi. CaHV-1 utječe na reprodukciju kuja u vidu resorpcije zametaka, pobačaja i uginuća plodova te posljedičnog otežanog okota. Također, mogući je uzrok pomora štenadi u prva tri tjedna života.

Zbog tropizma virusa za sluznice dišnog i spolnog sustava i jednostavnog prijenosa izravnim dodirom, te stvaranja latentnog kliconoštva, smatra se da je najveća cirkulacija virusa u uzgajivačnicama s većim brojem pasa i učestalim leglima. Danas se infekcija CaHV-1 smatra uzrokom najvećih gospodarskih gubitaka u uzgajivačnicama, ali dio patologije reprodukcije koja je posljedica infekcije CaHV-1 (na temelju anamneze, kliničke slike, patoanatomskog i patohistološkog nalaza) ostaje neistražena.

Osnovna zapreka u praćenju i suzbijanju ove bolesti su ograničenja dijagnostike. Na temelju sporadičnih uzoraka koji se šalju u laboratorij na dijagnostiku nije moguće utvrditi imunološki status životinje zbog izrazitog variranja titra protutijela i dobivanja lažno negativnih rezultata. Za određivanje serološkog statusa kuja potrebno je pretražiti minimalno dva seruma uzetih u različitim fazama spolnog cikusa. Također, kod određivanja serološkog statusa mužjaka, barem jedan pretraživani serum morao bi biti uzet u stresnoj fazi, odnosno u fazi smanjenog imuniteta (nakon putovanja, prisustvovanja izložbama, nakon parenja ili u trenutku kada se u uzgajivačnici nalazi kuja u proestrusu ili estrusu). Nadalje, kod uginuća štenadi nije dovoljno postaviti sumnju na temelju kliničke slike i patoanatomskih nalaza, već je potrebno uzorke organa poslati na molekularnu dijagnostiku, kako bi se isključilo ili potvrdilo prisutstvo virusa. Molekularne metode dijagnostike mogu koristiti i za dokaz virusa u latentnih kliconoša, međutim potrebno je uzimanje uzoraka (briseva spolnih organa, nosa, oka) u slučaju kliničke sumnje na oboljenje, ali i kako je već ranije navedeno kod uzimanja uzoraka seruma, u stresnoj fazi, kada je povećana vjerojatnost aktivne infekcije i izlučivanja virusa.

Sveukupno, dijagnostika herpesvirusne infekcije pasa je kompleksna, neovisno o metodi koja se koristi i vrsti pretraživanih uzoraka.

Osim ograničenja dijagnostike i ograničena uspješnost imunoprofilakse dodatno otežava kontrolu i suzbijanje ove infekcije. Zbog svega navedenog, primjena mjera opće profilakse, uz specifične mjere imunoprofilakse, danas je način kontrole CaHV-1 infekcije u populaciji pasa. Prepoznavanje, opisivanje i određivanje značajnosti pojedinih čimbenika rizika prvi je korak u ovom smjeru. Nažalost, u Republici Hrvatskoj još nije provedeno sustavno istraživanje epizootiologije i čimbenika rizika za pojavu infekcije CaHV-1. Isto tako i na svjetskoj razini slična istraživanja, u najmanju ruku, nedostaju. Uspostava sustavnog praćenja, suzbijanja te sustavni pristup dijagnostici CaHV-1, od prepoznavanja kliničke slike do odabira optimalne laboratorijske metode ili kombinacije metoda koje bi mogle dati što točniji rezultat, osnova su zaštite zdravlja i spriječavanja gospodarskih gubitaka pri uzgoju pasa.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Povijest i zemljopisna proširenost

CARMICHAEL i sur. (1965.) opisuju novu virusnu bolest štenadi. Uzročnik je pokazivao citopatogena svojstva na staničnim kulturama bubrežnih stanica i uzrokovao smrtnost u štenadi starih nekoliko dana, nakon kratke bolesti. U pokusu je štenad stara 24 do 36 sati ugibala šest do devet dana nakon intraperitonealnog izlaganja CaHV-1, odnosno nakon izlaganja virusu preko sluznice usta i nosa. Zabilježene su male razlike u težini ili trajanju bolesti s obzirom na ulazna vrata virusa. Jedan ili dva dana pred uginuće pojavljivali su se klinički znakovi, najčešće gubitak apetita, bol u trbuhu, brzo i plitko disanje, kod pojedine štenadi i točkasta krvarenja po koži na području trbuha i ždrijela. Kratko pred smrt pojavljivali su se i klinički znakovi od strane živčanog sustava. Patološki nalaz upućivao je na diseminirano žarišno odumiranje tkiva i krvarenja na plućima, jetrima i bubrezima praćeno s povećanjem svih limfnih čvorova i slezene. Histološki, prevladavala je diseminirana nekroza, a kao posljedica nekroze raspadanje i nestajanje fiziološke strukture tkiva. Unutar jezgara u stanicama bubrežnih glomerula opisane su uklopine. Virus je kod prvog opisa bolesti bio izdvojen iz gotovo svih tkiva (osim mozga i skeletnog mišićja) na primarnoj staničnoj kulturi bubrega pasa starih do tri mjeseca.

Od prvog opisa bolesti prisutnost CaHV-1 dokazana je širom svijeta, a novija istraživanja ukazuju da je prevalencija infekcije puno veća nego se pretpostavljalo (RONSSE i sur., 2005., STRÖM HOLST i sur., 2012., YESILBAG i sur., 2012., PRATELLI i sur., 2014., KROGENÆS i sur., 2014., CHELARU, 2014., LARSEN i sur., 2015., MANTZIARAS i sur., 2016., LARA i sur., 2016.a., COBZARIU i sur., 2018.). Od prvog opisa bolesti objavljeno je i niz radova, a iz recentnih radova može se pratiti visoka seroprevalencija, bez obzira na metode koje su korištene u dijagnostici.

Najviša prevalencija opisana je u Finskoj gdje je u uzgajivačnicama s reproduktivnim problemima, virus neutralizacijskim testom (VNT) utvrđena 100% seroprevalencija, a u uzgajivačnicama bez reproduktivnih problema, seroprevalencija od 65% (DAHLBOM i sur., 2009.).

U Belgiji je opisana seroprevalencija, imunoenzimnim testom (*engl. enzyme - linked immunosorbent assay*, ELISA), bila 45,75% (RONSSE i sur., 2002.). Nadalje, u Norveškoj je opisana znatno viša seroprevalencija, od 80%, određena ELISA metodom (KROGENÆS i sur., 2012.) i od 85,5%, određena VNT (KROGENÆS i sur., 2014.). Visoka seroprevalencija ustanovljena je i u pasa u Nizozemskoj i Velikoj Britaniji. U Nizozemskoj, utvrđena

seroprevalencija iznosla je 39,3% korištenjem ELISA metode u pasa smještenih u uzgajivačnicama (RIJSEWIJK i sur., 1999.). U Velikoj Britaniji, seroprevalencija CaHV-1 je iznosla 88% (dokazom IgG protutijela) i 76% (dokazom IgM protutijela) ELISA metodom te 76% korištenjem VNT (READING i FIELD, 1998.).

Novija istraživanja seroprevalencije CaHV-1 provedena su u Turskoj i utvrđeno je 39,3% seropozitivnih pasa ELISA metodom i 29,4% pomoću VNT, s višom seroprevalencijom (62,1%) u pasa iz uzgajivačnica (YESILBAG i sur., 2012.). U Litvi, opisano je 85% seropozitivnih pasa iz uzgajivačnica i 11% seropozitivnih kućnih ljubimaca ELISA metodom (MUSAYEVA i sur., 2013.). U Italiji, opisana je ukupna seroprevalencija od 14,6% dobivena VNT i 18,6% metodom imunoflorescencije (PRATELLI i sur., 2014.). ELISA metodom je u Rumunskoj utvrđena visoka seroprevalencija (86,6%) kod pasa iz uzgajivačnica (COBZARIU i sur., 2018.) te niska seroprevalencija (22,55%) u pojedinačno držanih pasa (CHELARU, 2014.). Također, u Meksiku utvrđena je visoka seroprevalencija (87%) ELISA metodom u pasa držanih u uzgajivačnici (LARA i sur., 2016.a.).

Metodom lančane reakcije polimerazom (*engl. Polymerase Chain Reaction,* PCR) u Danskoj utvrđena je prisutnost CaHV-1 u 22,8% štenadi od ukupno 57 uginule štenadi (LARSEN i sur., 2015.). MANTZIARAS i sur. (2016.) PCR metodom u organima tri uginula šteneta dokazuju prvu pojavu CaHV-1 u Grčkoj. U Meksiku, iz organa (bubrega, jetara i pluća) tri šteneta uginula u prva četiri tjedna života dokazan je CaHV-1 direktnom imunofluorescencijom, elektronskom mikroskopijom i PCR-om (LARA i sur., 2016.b.).

RONSSE i sur. (2005.) navode rezultat od 60% stalno seropozitivnih pasa, koristeći ELISA metodu. Za preostalih 40% pasa u istraživanju navode da su tijekom ciklusa jednom ili dva puta imali negativni rezultat seroloških pretraga. Opisane promjene u titru protutijela, zajedno s latencijom, zahtjevaju ponovljene pretrage seruma kako bi se odredio pravi serološki status životinje. Navode i da je viša seroprevalencija prisutna u većim uzgajivačnicama, pogotovo s lošijim higijenskim uvjetima i prisutnim 'kašljem legla' u povijesti uzgajivačnice. Značaj prijenosa virusa izravnim kontaktom tumače kroz slične vrijednosti titra protutijela kod parenih i kuja koje nisu parene. Isto tako, PCR metodom iz briseva rodnice i nosa nisu izdvojili CaHV-1, što tumače da rezultatima treba pristupiti s oprezom, jer u uvjetima gdje je CaHV-1 enzootičan i imunost je prisutna, izlučivanje virusa je vjerojatno kratko i traje samo nekoliko dana.

U skladu s rezultatima spomenutog istraživanja su i podaci iz novije literature gdje nema opisanog dokaza CaHV-1 izdvojenoga iz brisa rodnice kuja. PRATELLI i sur. (2014.)

proveli su uzorkovanje u 16 kuja (ukupno 13 kuja je imalo reproduktivnu patologiju). Prilikom uzorkovanja ne nalaze vaginalne lezije, što navode kao mogući razlog negativnog rezultata, kao i kratko vrijeme izlučivnje samog virusa. STRÖM HOLST i sur. (2012.), u seropozitivnih 20 kuja (u 12 kuja sa reproduktivnim poremetnjama i u osam kontrolnih kuja), uzimajući uzastopnih šest odnosno osam obriska tokom ciklusa, počevši od estrusa, također ne dokazuju CaHV-1 niti u jednom obrisku. STRÖM HOLST i sur. (2012.) navode zaključak (na osnovi seroloških podataka) da je CaHV-1 uobičajena infekcija kod pasa u Švedskoj i da promjene u titru protutijela nisu povezane s izlučivanjem CaHV-1 putem rodnice.

BOTTINELLI i sur. (2016.) od 27 uzorkovanih kuja u estrusu i nakon okota također ne dokazuju CaHV-1 niti u jednom brisu rodnice.

Za razliku od toga, u starijoj literaturi opisani su dokazi CaHV-1 izdvajanjem iz rodnice. Tako su OKUDA i sur. (1993.) šest mjeseci nakon prirodne infekcije proveli petodnevni tretman kuja sa prednisolonom te uzimali uzastopne obriske od pet kuja. CaHV-1 izdvojen je iz obriska rodnice jedne kuje, iz jednog od uzastopnih osam obriska. Kod ostalih kuja, rađeno je od osam do 13 obriska i svi obrisci su bili negativni.

Također, MIYOSHI i sur. (1999.), nakon pokusnog zaražavanja kuja intravenski i intranazalno opisuju izolaciju CaHV-1 iz obrisaka sluznice nosa. Nakon pokusnog zaražavanja kuja putem rodnice, virus je bio izdvojen iz obriska nosa i rodnice. Obrisci su bili pozitivni četiri odnosno šest dana nakon inokulacije.

Iz navedenog je vidljivo da je dokaz izlučivanja CaHV-1 putem rodnice izuzetno težak, ali je moguć kod uzimanja niza uzoraka, svježe infekcije ili prisutne imunosupresije.

2.2. Etiologija

Pseći herpesvirus-1 (CaHV-1) svrstan je u skupinu virusa iz porodice *Herpesviridae*, potporodica *Alphaherpesvirinae*, rod *Varicellovirus.* Opisan je samo jedan serotip CaHV-1 (CARMICHAEL i GREEN, 1998.).

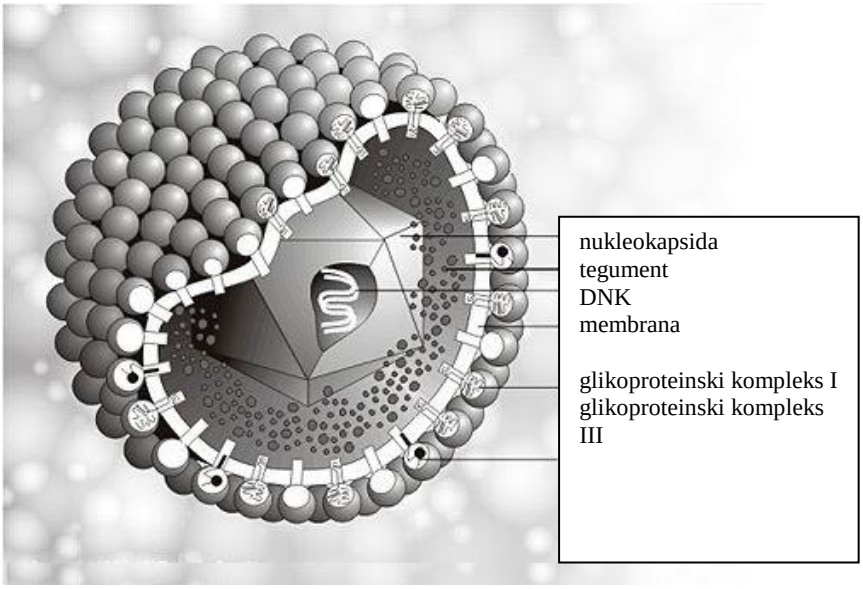
Pseći herpesvirus-1 neposredno je dokazan isključivo u pasa (KRAKOWKA, 1985.), ali protutijela za CaHV-1 dokazana su u serumu europske crvene lisice (*Vulpes vulpes*) u Australiji (ROBINSON i sur., 2005.) i Njemačkoj (TRUYEN i sur., 1998.) te u serumu sjevernoameričke riječne vidre (*Lontra canadensis*) iz države New York (KIMBER i sur., 2000.). Relativno mali broj primljivih vrsta za CaHV-1 (domaće i divlje vrste iz porodice

Canidae) posljedica je prisutnosti specifičnih receptora na površini stanice u malog broja životinja (NAKAMICHI i sur., 2000.). Virus sličan CaHV-1 izoliran je i iz štenadi kojota u zatočeništvu (EVERMANN i sur., 1984.).

Cjelokupna struktura CaHV-1 je nalik na ostale alfaherpesviruse i CaHV-1 je genetski srodan mačjem herpesvirusu tip 1 (*Felid alphaherpesvirus 1,* FHV-1), herpesvirusu foka tip 1 (*Phocid alphaherpesvirus 1,* PhoHV-1) i konjskom herpesvirusu tip 1 i 4 (*Equid alphaherpesvirus 1,* EHV-1 i *Equid alphaherpesvirus 4*, EHV-4*)* (ROTA i MAES, 1990., RÉMOND i sur., 1996., WILLOUGHBY i sur., 1999., MARTINA i sur., 2003.).

Duljina genoma CaHV-1 je 128 kilobaznih parova (REMOND i sur., 1996., PAPAGEORGIOU i sur., 2016.). Nizak postotak guanina i citozina je obilježje CaHV-1 (PLUMMER i sur., 1969.).

Virion CaHV-1 se sastoji od dvostruke deoksiribonukleinske kiseline (DNK) koju okružuje nukleokapsida, tegument i ovojnica. Kapsida ima strukturu ikozaedarne simetrije, svojstvenu za herpesviruse, tegument koji okružuje kapsidu se sastoji od bjelančevina, a ovojnica je građena od lipidne membrane na čijoj se površini nalazi 11 glikoproteina (PAPAGEORGIOU i sur., 2016.). Promjer viriona je 115-175 nm (CARMICHAEL i sur., 1965.), s molekularnom masom od 63 x 10^6 daltona (LUST i CARMICHAEL, 1974.).



Slika 1. Građa herpesvirusa. Preuzeto i prilagođeno iz: http://fractured-simplicity.net/daydreaming/media/flam/pages/indexl.php?u=canine-herpes-virus-1

2.2.1. Tenacitet CaHV-1

Lipidna struktura ovojnice čini virus nestabilnim u okolišu i osjetljivim na lipidna otapala (kloroform i eter) i druge uobičajene definficijense (kloramin, formaldehid, derivati fenola i kvaterni amonijevi spojevi) (GREEN, 2006.). CaHV-1 je temperaturno osjetljiv i inaktivira se na temperaturi višoj od 40 °C. Na temperaturi od 56 °C inaktivira se za pet do 10 minuta, a na temperaturi od 37 °C za 22 sata. Infektivnost CaHV-1 pada nakon 24 sata pri 4 °C, a nakon tri dana pri -20 °C. Virus je izrazito stabilan pri temperaturi -70 °C. Za stabilnost virusa potreban je i određeni pH između 6.5 i 7.6. Virus biva brzo inaktiviran pri vrijednostima pH ispod 5.0 ili iznad 8.0 (CARMICHAEL i sur., 1965., GREEN, 2006.).

Virus se *in vitro* umnaža u primarnim i linijskim staničnim kulturama bubrega ili testisa pasa, u kojima uzrokuje vidljiv citopatogeni učinak (CPU) u vidu stvaranja plakova i unutarjezgrenih uklopina tipa A (GREEN, 2006.). Optimalna temperatura za uzgoj herpesvirusa je od 35 °C do 36 °C. Temperatura viša od navedene spriječava umnažanje virusa.

2.3. Epizootiologija

Izvor infekcije su bolesne životinje i životinje kliconoše kao i njihove izlučevine. Širenje infekcije je najčešće izravnim dodirom, ali i preko posteljice. U odraslih životinja najčešća je kapljična ili infekcija spolnim putem, a ulazna vrata uzročnika su sluznica usta, nos ili spolnih organa (POSTE i KING, 1971.). U štenadi infekcija nastaje uslijed dodira s tjelesnim izlučevinama majke i dodirom između štenadi (POULET i DUBOURGET, 1993.). Infekcija preko posteljice opisana je u zadnjoj trećini gravidnosti (HASHIMOTO i sur., 1983.), a moguća je i tijekom embrionalnog stadija (POSTE i KING, 1971.).

Nakon infekcije, sa ili bez izraženih kliničkih znakova, psi ostaju latentno inficirani, što ima osobiti značaj u epizootiologiji bolesti. Nakon reaktivacije infekcije, ove životinje često izlučuju virus bez pojave ikakvih kliničkih znakova (OKUDA i sur., 1993, MIYOSHI i sur., 1999.). Do reaktivacije infekcije dolazi u stanjima kao što su stres, gravidnost, poodmakla dob, imunosupresivna terapija ili obolijevanje od drugih bolesti te se virus širi u sluznice gdje se umnaža i posljedično izlučuje (BURR i sur., 1996., CARMICHEL i GREEN, 1998., MIYOSHI i sur., 1999.).

Poticaj za reaktivaciju virusa je i proestrus i estrus (POSTE i KING, 1971.), a virus je izdvojen kod pojedinih bolesti poput kašlja legla (KAWAKAMI i sur., 2010., KRAFT i sur. 1986.), štenećaka (MOTOHASHI i TAJIMA, 1966.) i malignog limfoma (KAKUK i sur., 1969.). Pokusno je dokazana reaktivacija virusa prilikom davanja visokih doza prednizolona (OKUDA i sur., 1993.).

Problemi s plodnošću kuje te smrtnost plodova i štenadi stare do tri tjedna opisani su kod primarne infekcije (APELL, 1969., HASHIMOTO i sur., 1982.; CARMICHAEL i GREEN, 1990.).

Nakon primarne infekcije (preko sluznice usta, nosa ili spolnih organa) ili nakon reaktivacije, virus se izlučuje tri do pet dana, maksimalno dva do tri tjedna. Inokulacija virusa na sluznicu nosa može rezultirati izlučivanjem virusa u spolnom sustavu. Isto tako, infekcija spolnog sustava može dovesti do izlučivanja putem usta, nosa i spojnica (APPEL i sur., 1969., CARMICHAEL, 1970., HILL i MARE, 1974., OKUDA i sur., 1993., MIYOSHI i sur., 1999.).

2.3.1. Čimbenici rizika

U literaturi su opisani različiti čimbenici rizika vezanih za pojavu herpesvirusne infekcije.

Najčešći čimbenici rizika koji se navode su dob i imunosni status jedinke (OKUDA i sur., 1993., SEO i sur., 1994., RONSSE i sur., 2004.). Povećana serokonverzija je zabilježena u psa u dobi od jedne do dvije godine (što je moguće povezati s početkom spolne zrelosti) i u dobi od dvije do tri godine (prvo parenje). Također je opisan porast seroprevalencije do dobi od pet do šest godina (LACHERETZ i COGNARD, 1998., VAN GUCHT i sur., 2001.). RONSSE i sur. (2002.) opisuju da nije bilo značajne razlike u broju seropozitivnih pasa ovisno o reproduktivnom statusu, razlogu dolaska kod veterinara ili ovisno o spolu i pasmini. S druge strane, psi mlađi od šest mjeseci bili su uglavnom serološki negativni. Od nastupa puberteta do dvije godine starosti, u određenih pasa dolazi do serokonverzije, što povezuju s parenjem, ali samo kod mužjaka. Također, psi koji potječu iz uzgajivačnica u kojih je zabilježena pojava 'kašlja legla' imaju viši titar protutijela, kao i u uzgajivačnicama s više od šest pasa i slabijom higijenom. 'Kašalj legla' ili zarazna upala dušnika i bronha je upala gornjih dišnih prohoda kod koje, u kliničkoj slici, dominira glasni i učestali kašalj. Virusne i bakterijske je etiologije, najznačajniji uzročnici su *Bordetella bronhiseptica*, pseći virus

parainfluence i pseći adenovirus (FORD, 2006.). Značaj CaHV-1 u etiologiji 'kašlja legla' se smatra sporednim u odnosu na druge uzročnike (KAWAKAMI i sur., 2010.).

U istraživanju RONSSE i sur. (2004.) potvrđena je značajnost dobi kao čimbenika rizika, veličina skupine u kojoj su držani psi te povijest pojave ″kašlja legla″ u uzgajivačnici. Faza spolnog ciklusa i povijest reproduktivnih poremećaja nisu potvrđeni kao značajni čimbenici rizika. Autori istog istraživanja sugeriraju da cijepljenje protiv 'kašlja legla' može smanjiti i širenje CaHV-1 zbog ublaživanja intenzivnog kašlja koji pogoduje širenju kapljične infekcije.

DAHLBOM i sur. (2009.) navode da je držanje pasa u većim skupinama jedan od mogućih čimbenika rizika za nastanak infekcije. Također, GUIGAL i sur. (2002.) sugeriraju da veličina uzgajivačnice može utjecati na stopu seropozitivnosti.

KROGENEAS i sur. (2014.) istražuju utjecaj godišnjeg doba na visinu titra protutijela za CaHV-1, te prikazuju podatak da su svi uzorci seronegativnih pasa sakupljeni u zimskom i proljetnom razdoblju, odnosno da tijekom ljeta i jeseni nije sakupljen niti jedan negativan niti slabo pozitivan serum.

Novije istraživanje koje objavljuju BOTTINELLI i sur. (2016.), praktički je opovrgnulo kao značajne sve prije navedene čimbenike rizika: dob, spol, pasminu, posjet izložbama i broj parenja što sveukupno gledajući govori o, u najmanju ruku, složenoj epizootiologiji ove bolesti.

2.4. Patogeneza

CaHV-1 ima tropizam za sluznice gornjih dišnih prohoda i spolnih organa, za središnji živčani sustav i endotel krvožilnog sustava (OKUDA i sur., 1993.).

Osjetljivost štenadi na infekciju u prva tri tjedna života povezana je s nedovoljno razvijenom termoregulacijom koja pogoduje umnažanju virusa CaHV-1. Kolostralna imunost može biti presudna, jer dovoljno visok titar protutijela može zaštiti štenad od bolesti, ali ne i od stvaranja latentne infekcije (CARMICHAEL, 1970., HUXSOLL i HEMELT, 1970.).

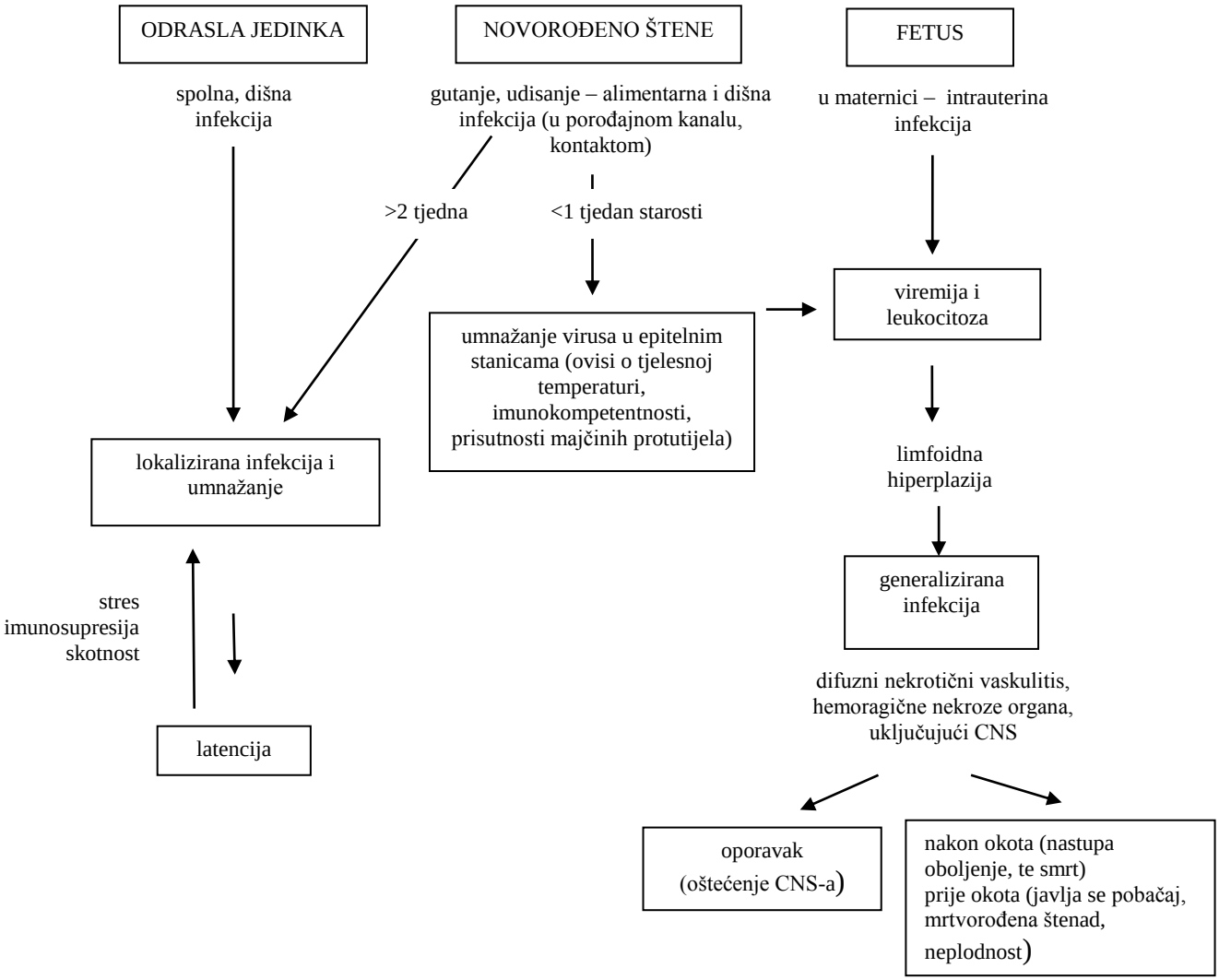
Kod štenadi s niskim titrom majčinskih protutijela dolazi do umnažanja virusa u sluznici ždrijela i krajnicima te područnim limfnim čvorovima (limfni čvorovi ždrijela i bronhalni limfni čvorovi). Slijedi razvoj viremije, koja rezultira hiperplazijom i limfoidnom nekrozom slezene i dubokih limfnih čvorova (sredogruđa, donjeg dijela trbušne šupljine i

limfnih čvorova nabora potrbušnice). Posljedično, vitalni organi postaju punokrvni i zahvaćeni razasutim žarišnim odmumiranjima tkiva, koje su posljedica infekcije endotela krvnih žila (SCHULZE i BAUMGARTNER, 1998.). Središnji i periferni živčani sustav je također zahvaćen, a iako se infekcija širi krvlju (PERCY i sur., 1970.), širenje završetcima osjetilnih živaca također je opisano (MIYOSHI i sur., 1999.).

Kod štenadi starije od tri tjedna i odraslih pasa, nakon ulaska virusa u organizam preko sluznice nosa i ustiju, umnažanje virusa se odvija u ždrijelu, tonzilama i područnim limfnim čvorovima. Ponekad su zahvaćena i pluća (APPEL i sur., 1969., CARMICHAEL i GREEN, 1998.). Samo u određenim slučajevima dolazi do viremije. Nakon lokalne infekcije, virus ili biva uklonjen ili dolazi do razvoja latentne infekcije. U latentno inficiranih životinja virus je dokazan PCR metodom u trigeminalnim ganglijima, lumbo-sakralnim živčanim završetcima, tonzilama, žlijezdama slinovnicama, limfnim čvorovima (podviličnim, limfnim čvorovima ždrijela, plućnim i mezenteričnim), jetri, bubrezima, slezeni i dijelu srednjeg mozga (OKUDA i sur., 1993., BURR i sur., 1996., CARMICHAEL i GREENE, 1998., MIYOSHI i sur., 1999.).

Nakon infekcije spolnim putem, virus se umnaža u sluznici rodnice ili prepucija (SCHULZE i BAUMGERTNER, 1998.). Virus može biti ili uklonjen ili dolazi do razvoja latentne infekcije, ako virus putem završetaka osjetnih živaca dospije do lumosakralnih ganglija. Na taj način živčani gangliji mogu 'udomaćiti' latentni virus i odigrati ulogu u prijenosu spolnim putem (BURR i sur., 1996.).

Nakon reaktivacije virusa ili primarne infekcije tijekom druge polovice gravidnosti kuje, postoji mogućnost prijenosa CaHV-1 preko posteljice na plodove. Virus se može izdvojiti iz posteljice te iz drugih organa ploda (jetra, pluća, bubrezi, slezena) (HASHIMOTO i sur. 1982., HASHIMOTO i sur. 1983.). Lezije posteljice mogu biti povezane sa slabijim razvojem ploda koji vodi do pobačaja ili do mrtvorođene štenadi (HASHIMOTO i sur., 1979., POULET i sur., 2001.). Mehanizam reaktivacije virusa s posljedičnim pobačajem, mumifikacijom ili mrtvorođenom štenadi, treba biti još razjašnjen (MIYOSHI i sur., 1999.).



Slika 2. Patogeneza CaHV-1 infekcije. Preuzeto i prilagođeno iz: GREEN, 2012.

2.5. Klinička slika

Infekcija CaHV-1 u pasa može imati klinički ili subklinički tijek. Kliničko očitovanje najčešće je u jedinki oslabljenog imunološkog sustava, štenadi i gravidnih kuja, ali i svih ostalih u stanju stresa (ANVIK, 1991., OKUDA i sur., 1993.). Iako se danas istražuje uloga CaHV-1 kao primarnog patogena unutar sindroma poznatog kao ″kašalj legla″, virus se u populaciji pasa najčešće očituje i širi kao infekcija dišnog sustava, za koju je svojstvena upala spojnica, serozni ili mukopurulentni očni i/ili nosni iscjedak (RONSSE i sur., 2005.). U odraslih pasa infekcija spolnog sustava dovodi do razvoja vezikularne upale stidnice i rodnice

u kuja i glave penisa i prepucija u mužjaka. Lezije spolnog sustava nestaju kratko nakon infekcije, ali se mogu ponovno pojaviti početkom proestrusa (POSTE i KING, 1971.).

U kuja se infekcija očituje neplodnošću i izostankom začeća, pobačajem, djelomičnim pobačajem (resorpcijom zametka i ploda), mumifikacijom plodova, nerazvijenim plodovima, mrtvorođenom štenadi, malim leglima te preranim štenjenjem. Kuja može imati mrtve i/ili mumificirane plodove u istom leglu kao i virusom nezahvaćenu živu štenad. Ako je skotna kuja inficirana trideseti dan gravidnosti, pobačaj se pojavljuje između 44. i 51. dana skotnosti (HASHIMOTO i sur., 1982., HASHIMOTO i sur., 1983., HASHIMOTO i HIRAI, 1986., EVERMAN, 1989.).

Štenad u dobi do tri tjedna može oboljeti od septikemijskog oblika bolesti s čestim smrtnim ishodom (APPEL i sur., 1969., POSTE i KING 1971., GREENE i CARMICHAEL, 2006.). Bolest se očituje ili perakutno ili se u roku od 48 sati razvije neonatalna viremija koja rezultira visokim pomorom. U štenadi koja ugiba u prvim danima života, postavlja se sumnja da su inficirani prije poroda. U štenadi inficiranih pri rođenju ili u prvim danima života dolazi do generalizirane infekcije, klinički znakovi se pojavljuju četiri do šest dana nakon infekcije, a sistemska infekcija se razvije devet dana nakon štenjenja (CARMICHAEL i GREENE, 1998.).

Klinički znakovi u štenadi obuhvaćaju: bezvoljnost, probavne poremećaje (gubitak apetita, slinjenje, povraćenje, mekana i sivo-žuta stolica); bolno cviljenje i bolnost prilikom palpacije abdomena; poremećaje od strane dišnog sustava (kihanje, sluzavognojni ili krvavi nosni iscjedak, otežano disanje); znakove od strane živčanog sustava (nekoordinirano kretanje, pedaliranje, zabacivanje glave); promjene na očima (upala spojnica, mrežnice, upala srednje očne ovojnice, rožnice, zamućenje leće); potkožni edemi, papule ili vezikule na trbušnoj ili preponskoj regiji; točkasta krvarenja, krvarenja ili vezikule na sluznici ustiju i spolnim organima i pothlađenost. Ako je infekcija perakutna ili akutna, neurološki se znakovi ne razviju (KAKUK i CONNER, 1970., ALBERT i sur., 1976.). U slučaju razvijanja neuroloških znakova i preživljavanja štenadi, neurološki deficiti (sljepoća i nekoordinirano kretanje) mogu ostati trajno (HUXSOLL i HEMELT, 1970.). Štenad s odgovarajućim imunitetom ne razvija kliničke znakove, ali postaju latentni nosioci (HASHIMOTO i HIRAI, 1986.).

U mladih pasa u dobi tri do dvanaest tjedana bolest se pojavljuje u blagom kliničkom obliku; u kasnijoj dobi opisane su infekcije dišnog sustava i oka (RONSSE i sur., 2003.). Promjene na očima u odraslih pasa ograničene su na upalu spojnica te mogu biti praćene

kliničkim znakovima infekcije dišnog i spolnog sustava (HILL i MARE, 1974., CARMICHAEL i GREENE, 1998.).

2.6. Razudbeni nalaz

Najčešći razudbeni nalaz u štenadi uginule od CaHV-1 su točkasta krvarenja po sluznicama kod akutne infekcije i diseminirane žarišne nekroze kod subakutne infekcije. Lezije su prisutne na bubrezima, jetrima i plućima, ali se mogu naći i na slezeni, mozgu, srcu, timusu, nadbubrežnim žlijezdama i crijevima (POULET i sur., 1993., SCHULZE i BAUMGARTNER, 1998.). Prisutno je povećanje slezene i svih limfnih čvorova, te serozni ili sero-hemoragični izljevi u prsnu šupljinu. Pluća su generalizirano edematozna, s izrazitom punokrvnošću i čestim seroznim i sero-hemoragični pleuralnim izljevima. Pojava žutice je rijetka kao i punokrvnost moždanih ovojnica (DURHAM i POOLE, 1979.).

Posteljica ploda u kuja inficiranih s CaHV-1 je nerazvijena i punokrvna, sa sivo bijelim žarištima različitih veličina (od milijarnih do zrnca riže). Ponekad lezije formiraju zonalne strukture široke dva do tri milimetra (HASHIMOTO i HIRAI, 1986., EVERMAN, 1989.).

Značajke patohistološkog nalaza u novorođene štenadi su žarišta perivaskularne nekroze i umjerene infiltracije makrofaga i limfocita. Nekroza je generalizirana i dolazi do gubitka strukture parenhimskih tkiva (POULET i sur. 1993.). Stanična infiltracija je izraženija u slučaju subakutne infekcije nego u akutnoj infekciji (SCHULZE i BAUMGARTNER, 1998.). Najopsežnije lezije su na plućima, bubrezima, jetri, slezeni, dvanaesniku i mozgu. Lezije su slabije izražene na gušterači, nadbubrežnim žlijezdama, mrežnici i srčanom mišiću. U slezeni i u limfnim čvorovima je prisutna hiperplazija mononuklearnih fagocita. Na razini živčanog sustava, opisan je multifokalna granulomatozna upala mozga i moždanih ovojnica i ganglio-neuritis (posebno trigeminalnog ganglija) (PERCY i sur., 1970.). Kod upale mozga i moždanih ovojnica značajan je nalaz povećane perivaskularne stanične proliferacije, posebno na području moždanog debla i malog mozga. Cerebralna displazija i displazija mrežnice je česti nalaz, a uklopine (posebno intranuklearne) mogu se vidjeti u stanicama na periferiji nekrotičnog žarišta (PERCY i sur., 1971.). Uklopine su brojnije u subakutnoj infekciji nego u akutnoj. Uklopine nalazimo u nosnim i bubrežnim epitelnim stanicama, u epitelnim stanicama pluća i jetre. Rijeđe se nalaze u mezenhimalnim stanicama, endotelnim stanicama i srčanim miocitima (CARMICHAEL i GREEN, 1998.).

U slučaju infekcije gravidnih kuja, opisana je slabije razvijena posteljica s mnogostrukim žarišnim nekrozama. Većina lezija je nađena uz ugruške na rubovima posteljice (HASHIMOTO i sur., 1982.).

Kod odraslih životinja, papulovezikularne lezije na sluznici i koži uzrokovane su dubokom degeneracijom epitelnih stanica, što rezultira izrazitom akantolizom (HILL i MARE, 1974.).

2.7. Dijagnostika

Sumnja na prisutnost CaHV-1 u uzgoju može se postaviti na temelju anamnestičkih podataka (pobačaji, mrtvorođena štenad, uginuća štenadi do tri tjedna starosti), uočenih kliničkih znakova (lezije na spolnim organima kod odraslih jedinki, klinički znakovi kod novorođene štenadi, klinička slika oboljenja dišnog sustava) i općeg pregleda. Od biokemijskih i hematoloških pokazatelja u oboljele štenadi povišena je vrijednost alanin aminotransferaze (CARMICHAEL i GREEN, 1998.), a vrijednosti ukupnog broja krvnih pločica su stalno snižene (KAKUK i CONNER, 1970.).

Laboratorijska dijagnostika virusnih bolesti najčešće uključuje četiri različite metode, s različitim stupnjem osjetljivosti i specifičnosti (KENNEDY, 2005., EVERMANN i sur., 2006., BOIVIN i sur., 2009., MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). To su: dokaz nukleinske kiseline (PCR i *in situ* hibridizacija), izdvajanje virusa na kulturi stanica, dokaz antigena imunološkim metodama (ELISA, imunoflorescencija, imunoperoksidaza, imunohistokemija) i serološke metode za otkrivanje specifičnih protutijela.

2.7.1. Dokaz uzročnika

2.7.1.1. Dokaz nukleinske kiseline

Lančana reakcija polimerazom je *in vitro* metoda enzimatske sinteze odsječka virusne DNK koja se temelji na hibridizaciji specifičnih oligonukleotida (početnica) i sintezi kopija željenog fragmenta koji je ograničen navedenim početnicama. Početnice su neophodne za osiguravanje potrebnog supstrata DNK polimerazi za dodavanje novih nukleotida i za usmjeravanje reakcije na specifičnu regiju za umnažanje DNK. Visoka osjetljivost

omogućava dokaz male količine nukleinske kiseline te njeno umnažanje u veliki broj kopija koje se mogu vizualizirati.

Za dokaz CaHV-1 PCR metodom opisani su različiti postupci izvođenja. Najčešće se koriste: metoda ugniježđene PCR (SCHULZE i BAUMGÄRTNER, 1998.), PCR u stvarnom vremenu (DECARO i sur., 2010.) i panherpes PCR (VANDEVANTER i sur., 1996.). Prema metodi ugniježđene PCR (SCHULZE i BAUMGÄRTNER, 1998.) umnaža se dio gena za timidin kinazu psećeg herpesvirusa; s prvim parom početnica se umnaža fragment od 493 parova baza, a s drugim parom fragment od 168 parova baza. Prema metodi PCR u stvarnom vremenu (DECARO i sur., 2010.) umnaža se dio gena za glikoprotein B. Navedena metoda je visokospecifična jer nema križne reakcije s drugim DNK psećim virusima, osjetljivija je od PCR metode u kojoj se umnaža dio gena za timidin kinaze te omogućava istovremeno i detekciju i kvantitativno određivanje DNK od CaHV-1 međutim osnovno ograničenje za ovu metodu je znatno viša cijena pretrage. Panherpes PCR (VANDEVANTER i sur., 1996.) je metoda kojom se umnaža dio gena za herpesvirusnu DNK polimerazu – oko 250 parova baza.

DNK CaHV-1 se najčešće može izdvojiti iz unutarnjih organa uginule štenadi (iz bubrega, jetara, pluća, slezene, limfnih čvorova i nadbubrežne žlijezde), iz obrisaka sluznice usta, nosa i spolnih organa (CARMICHAEL i GREEN, 1998.). Izolacija DNK virusa je moguća iz uzoraka tkiva fiksiranih u formalinu (SCHULZE i BAUMGÄRTNER, 1998., KIM, 2004., KAPIL, 2015.).

2.7.1.2. Izdvajanje CaHV-1 na kulturi stanica

Iako je PCR metoda dostupna u bolje opremljenim dijagnostičkim laboratorijima, ona u određenim situacijama može biti nedovoljno osjetljiva. Stoga je ponekad u dijagnostici infekcije CaHV-1 potrebno načiniti izdvajanje uzročnika (GREEN, 2012.).

Linijske stanične kulture bubrega psa koriste se za izdvajanje CaHV-1 u laboratoriju (MURPHY i sur., 1999.). Specifične degenerativne promjene razviju se kroz nekoliko dana i vidljive su kao plakovi. Značajno je istaknuti za pouzdanost ove metode da je CaHV-1 labilan te postmortalne promijene koje se razvijaju nakon uginuća smanjuju mogućnost izdvajanja virusa. Kod slanja uzoraka u laboratorij, male količine uzoraka su dovoljne za uzgoj virusa na staničnim kulturama (0.5 – 1.0 ml), a uzorci mogu biti poslani svježi, ohlađeni ili smrznuti (-20 °C) (ROOTWELT i sur., 2011.).

Dokaz uzročnika CaHV-1 infekcije izrazito ovisi o pravilnom odabiru i uzimanju uzoraka te njihovoj pravilnoj pohrani. Najbolje vrijeme za uzimanje uzoraka je u akutnoj fazi bolesti, kada je uzročnik u najvišoj koncentraciji u tjelesnim tekućinama, izlučevinama, sekretu ili krvi (BOIVIN i sur., 2009., FLINT i sur., 2009., MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.), a uzorci mogu biti uzeti i nakon uginuća. Nakon primarne infekcije (oronazalno ili genitalnim putem) ili nakon reaktivacije, virus se izlučuje tri do pet dana i maksimalno u trajanju od dva do tri tjedna (CARMICHAEL, 1970., OKUDA i sur., 1993.). U tom razdoblju je svrsishodno uzeti obriske sluznica kako bi se ustanovila prisutnost uzročnika.

Svježi uzorci, u slučaju brzog transporta (12 - 48 sati) trebaju biti ohlađeni, a kod duljeg transporta (dva do četiri dana) smrznuti i transpotirani na ledu. Preporučljivo je kontaktirati laboratorij za pravilno uzimanje uzoraka, obrade uzoraka i načina slanja (GREEN, 2012.). Na temperaturi od -70 °C uzorci mogu biti uskladišteni neograničeno.

2.7.1.3. Dokaz antigena imunološkim metodama i serološke metode za otkrivanje specifičnih protutijela

Za dokaz antigena i za otkrivanje specifičnih protutijela u dijagnostici CaHV-1 u literaturi su opisane slijedeće metode: za dokaz antigena imunološkom metodom opisana je ELISA, a od seroloških metoda za otkrivanje specifičnih protutijela opisan je: VNT, indirektna imunofluorescencija (IF) i inhibicija hemaglutinacije (IHA) (RONSSE i sur., 2002., BOTTINELLI i sur., 2016.). Od navedenih seroloških metoda u dijagnostici CaHV-1 najčešće se koriste VNT i ELISA. Zbog visoke pouzdanosti, VNT se često koristi i navodi kao zlatni standard (RONSSE i sur., 2002., YESILBAG i sur., 2012.), dok se ELISA koristi zbog visoke osjetljivosti (RONSSE i sur., 2002., YESILBAG i sur., 2012., BOTTINELLI i sur., 2016.).

Kod tumačenja rezultata treba obratiti pažnju na korištenu serološku metodu. Na primjer, u Turskoj (YESILBAG i sur., 2012.) utvrđuju 39,3% pozitivnih pasa ELISA metodom, a 29,4% VNT. Višu seropozitivnost pasa dobivenu ELISA metodom navedeni autori objašnjavaju njenom većom osjetljivošću u usporedbi sa VNT. RONSSE i sur. (2002.) uspoređuju ELISA-u i dvije metode VNT kako bi odredili točnost rezultata. Potvrđuju veću osjetljivost ELISA-e usporedbom uzoraka koji su ELISA metodom bili seropozitivni, a seronegativni u oba VNT. Ostali seropozitivni uzorci pripadaju psima ili s izrazito niskim

titrom protutijela ili negativnim životinjama ali koji su proglašeni pozitivnim zbog nespecifičnih reakcija kod niskih serumskih razrjeđenja.

Nema opće prihvaćenog protokola za izvođenje virus neutralizacijskog testa. Pojedini autori (NÖTHLING i sur. 2008., BOTTINELLI i sur., 2016.) koriste metodu u kojoj prvotno ispitujući serum toplinski inaktiviraju (kako bi inaktivirali endogeni komplement) bez naknadnog dodavanja komplementa. Također, pojedini autori (FREYEN i sur., 2004., KAWAKAMI i sur., 2010., YESILBAG i sur., 2012.) ispitujući serum toplinski inaktiviraju, ali u nastavku postupka koriste serum zamorčića kao izvor komplementa. RONSSE i sur. (2002.) u svom istraživanju uspoređuju dvije predhodno navedene metode VNT, sa i bez dodavanja komplementa (seruma zamorčića). Navode zaključak da dodatak komplementa nije povećao osjetljivost VNT.

Nadalje, vrlo je važno naglasiti da serološki nalazi moraju biti pažljivo interpretirani, zbog slabe imunogenosti CaHV-1 i stvaranja protutijela koja su prisutna nekoliko mjeseci nakon infekcije. Razina protutijela se može samo ponekad odrediti i do dvije godine nakon infekcije, ovisno o testu koji se koristi (CARMICHAEL i GREENE, 2006., NÖTHLING i sur., 2008.). Tumačenje rezultata seroloških pretraga posebno otežava i činjenica da u kuja titar protutijela znatno varira ovisno o fazi spolnog ciklusa (STRÖM HOLST i sur., 2012.). Prisutnost protutijela nije uvijek povezana s aktivnom infekcijom, a latentno inficirane životinje mogu biti seronegativne. Pozitivan rezultat može biti značajan tijekom pojave problema u plodnosti i uginuća štenadi do tri tjedna starosti, pogotovo kod odraslih jedinki koje su bile negativne u predhodnim pretragama. Serološkim metodama moguće je dobiti uvid u stupanj cirkulacije virusa u uzgoju. Procjena seroloških nalaza u novorođene štenadi ne daje pouzdane rezultate, jer nemaju vremena stvoriti protutijela prije uginuća (POULET i DUBOURGET, 1993.). Lokalno izlučivanje virusa (putem nosa ili spolnih organa) nije uvijek povezano sa serokonverzijom (HILL i MARE, 1974.).

2.8. Liječenje

U odraslih pasa, herpesvirusna infekcija je uglavnom asimptomatska i samolimitirajuća te liječenje nije potrebno. Antivirusno liječenje u životinja općenito je slabo opisano (FIELD i sur., 2006.). Liječenje zahvaćenog dišnog sustava i očiju je simptomatsko. Uporaba antibiotika ima ulogu potporne terapije za ograničene lezije, dok specifična terapija

za genitalne lezije ne postoji. Uporaba antivirusnih kemoterapeutika, kao u humanoj medicini, nije proširena (GREEN, 2006.).

Zbog brzog napredovanja generalizirane infekcije, liječenje u novorođene štenadi često ne pomaže. Pristupa se antibiotskoj terapiji i terapiji tekućinom te po potrebi, hranjenju na sondu. Primjena antivirusnih lijekova je generalno dokazana kao neučinkovita, s mogućnim rezidualnim lezijama središnjeg živčanog sustava i srca (CARMICHAEL, 1999.).

Opisana je upotreba laktoferina, bjelančevine koja na sebe veže željezo, a nalazi se u mlijeku i inhibira umnožavanje CaHV-1 u staničnim kulturama. On se koristi lokalno za terapiju drugih virusnih infekcija sluznica. Laktoferin može biti davan na usta kao zaštita izložene, a klinički zdrave štenadi, kada se sumnja na mogućnost ulaska virusa u organizam putem ustiju i nosa (TANAKA i sur., 2003.). Opisani su i drugi pripravci, kao što je vidarabin, i njegova se uporaba u leglu gdje je već došlo do uginuća štenadi pokazala uspješnom. Preživjela štenad dva mjeseca kasnije imala je titar protutijela veći od 64, što dokazuje da su bila inficirana. Primjena antivirusne terapije može sačuvati život štendi, ali nakon liječenja mogu ostati prisutna oštećenja središnjeg živčanog sustava i srčanog mišića kao posljedica preboljenja bolesti. Prije početka liječenja vlasnici štenadi moraju biti upoznati s mogućim nuspojavama (GREEN, 2006.)

Aciklovir, u cilju kočenja sinteze virusne DNK u stanicama inficiranim s CaHV-1 i minimalnog utjecaja na normalne stanične procese u neinficiranim stanicama, je pokusno korišten u dozi od 10-20 mg/kg kroz tjedan dana (DAVIDSON i sur., 2003.; GREEN i CARMICHAEL, 2006.). Uobičajene nuspojave predoziranja aciclovirom su izostanak apetita i blagi simptomi od strane probavnog sustava. Mogući je pronalazak kristala u bubrezima te posljedična opstruktivna bolest bubrega (RICHARDSON, 2002.). Kao i kod drugih liječenja štenadi s prisutnim kliničkim znakovima CaHV-1 infekcije, i ovdje postoji mogućnost oštećenja miokarda i središnjeg živčanog sustava (GREEN i CARMICHAEL, 2006.).

U određenim slučajevima, nakon početka epizotije, smrtnost može biti smanjena davanjem jednog do dva mililitra hiperimunog seruma svakom štenetu intraperitonealno. Hiperimuni serum se dobiva od kuja koje su nedavno okotile leglo koje je uginulo od CaHV-1 ili cijepljenih životinja. Potrebna je samo jedna doza zbog kratkog osjetljivog perioda. Ova vrsta liječenja može pomoći u smanjenju gubitaka u izloženom leglu, ali uspjeh ovisi o prisutnosti zadovoljavajuće razine protutijela u serumu i o davanju seruma prije punog razvoja bolesti. Ako je došlo do razvoja kliničkih znakova poremećaja živčanog sustava, oni će vjerojatno ostaviti trajne posljedice (GREEN, 2006.).

Povišenje okolišne temperature u već zaražene štenadi nema učinka, ali može biti pokušano za zaštitu nezaražene preostale štenadi u leglu. Tek oštenenjene jedinke držane na 36.6 °C do 37.7 °C i 45% do 55% vlage uspjevaju održati tjelesnu tempearturu u rasponu od 38.4 °C do 39.5 °C. U pokusnim uvjetima, u kojima je tjelesna temperatura umjetno povišena prije izlaganju virusu, u štendi je smanjena smrtnost, a jačina kliničkih znakova i patološke promjene su bile manje izražene. Kod povišene temperature, umnažanje virusa u tkivima je ograničeno u odnosu na umnažanje u uobičajeno držane štenadi (GREEN, 2006.).

2.9. Prevencija

Osnova suzbijanja CaHV-1 infekcije pasa je prevencija, u smislu općih profilaktičkih mjera i mjera specifične imunoprofilakse.

Preporučene opće mjere profilakse, u cilju spriječavanja infekcije i reaktivacije virusa, obuhvaćaju izolaciju kuje iz uzgoja i od mogućih stresora u zadnjoj trećini gravidnosti te izolirano držanje kuje s leglom u prva tri tjedna nakon okota (EVERMAN, 1989.). Uzgojne jedinke bi trebale izbjegavati duga putovanja, izložbe, natjecanja i stresne aktivnosti prije parenja i tijekom gravidnosti zbog reaktivacije. Druge infekcije također mogu potaknuti reaktivaciju CaHV-1, pa je potrebno voditi brigu o općem zdravlju kuje (ROOTWELT i sur., 2011.).

Pravilna higijena (uzročnik je osjetljiv na većinu dezinficijensa i nestabilan u okolini) te osiguravanje optimalne temperature za štenad (38-39 °C) u prva tri tjedna nakon okota uvelike smanuju mogućnost pojave bolesti (GREEN, 2006.).

Kao prevencija preporučuje se i praćenje općeg stanja rasplodnih jedinki, posebno dišnog i genitalnog sustava, tijekom estrusa i prije parenja. U slučaju pojave genitalnih lezija, uputno je uzeti bris za virusnu kulturu ili PCR i/ili uzorka krvi za procjenu serološkog statusa (GREEN, 2006.).

Zbog činjenice da većinu protutijela štenad dobiva kolostrumom, a manji dio tijekom gravidnosti kuje, bitno je da štenad primi kolostrum u prvih osam sati, kada je i moguć prolazak imunoglobulina kroz stijenku crijeva. Infekcija CaHV-1 je najčešće prisutna u štenadi kuja koje se prvi puta susreću sa CaHV-1 tijekom skotnosti. Ranije inficirane kuje imaju protutijela za CaHV-1 koja omogućavaju određenu zaštitu štenadi u prvih nekoliko tjedana (ROOTWELT i sur., 2011.).

Kako do infekcije može doći i intrauterino i tijekom porođaja, aktivnom imunizacijom kuje i prirodnom pasivnom imunizacijom štite se i plodovi i štenad nakon okota. Za aktivnu imunizaciju trenutno je na tržištu dostupno pročišćeno subjedinično cjepivo koje sadrži antigen herpes virusa psa soj F205, odnosno površinski glikoprotein B (gB) (ANONIMUS, 2002.). Prva aplikacija cjepiva preporuča se tijekom proestrusa, odnosno estrusa ili sedam do deset dana nakon parenja. Aplikcija se ponavlja jedan do dva tjedna prije očekivanog štenjenja (POULET i sur., 2001.). Ponovljeno cijepljenje omogućava visoku razinu protutijela u kolostrumu. Iako se pokazalo da cijepivo pruža dobru zaštitu u novorođene štenadi, zaštita je kratkotrajna kao i aktivna imunost u cijepljenih životinja, pa se preporuča ponoviti protokol cijepljenja kod svakog parenja (POULET i sur., 2001.). Cjepivo omogućava stvaranje maternalnog imuniteta te zaštitu legla u prva dva do tri tjedna starosti preko uzetog kolostruma.

Cjepivo za aktivnu imunizaciju za CaHV-1 nije svrstano u osnovna (obvezna) cjepiva te nije preporučljivo za sve kuje, kao ni cijepljenje odraslih pasa u svrhu prevencije infekcije dišnih puteva ili prevencije pojave lezija genitalnog trakta (DAY i sur., 2007.). Preporuča se samo u kuja koje su držane u većoj skupini pasa ili u uzgajivačnicama, a kuje koje ne žive u navedenim uvijetima, ako nisu došle u kontakt s kujama koja su nedavno pobacile, nije uputno cijepiti. Cijepljenje ne bi smjelo zamijeniti opće profilaktičke mjere, nego služiti kao dodatna zaštita (ROOTWELT i sur., 2011.). Cjepivo rijetko izaziva ozbiljne nuspojave. Mogu se pojaviti reakcije preosjetljivosti. One su rijetke i potrebno je primijeniti odgovarajuće simptomatsko liječenje. Injiciranje cjepiva može prouzročiti prolazni edem na mjestu uboda u manje od 10 % životinja. Navedene reakcije povlače se uglavnom za tjedan dana. Postotak urođenih mana u novorođene štenadi, postotak mrtvorođene štenadi i perinatalna uginuća nisu viša u cjepljenih kuja, u usporedbi s necjepljenim (ANONIMUS, 2002.). POULET i sur. (2001.) opisuju da cjepivo ima učinak na preživljavanje plodova u maternici, što je vidljivo iz podataka da cijepljene kuje imaju veći postotak gravidnosti, veću porođajnu masu štenadi i smanjeni pomor u periodu od okota do prestanka sisanja.

2.10. Fiziologija reprodukcije kuje, reproduktivni poremećaji i uzroci uginuća štenadi

2.10.1. Spolni ciklus kuja

Kuje su monoestrične životinje na čiji spolni ciklus ne utječe doba godine. Spontano ovuliraju, a faza aktivnosti žutog tijela traje 64±1 dan (u slučaju gravidnosti) odnosno do 90 dana ako kuja nije bila gravidna. Spolni ciklus kuje je podijeljen u četiri faze: proestrus (u trajanju od pet do 20 dana), estrus (u trajanju od pet do 15 dana), diestrus (u trajanju od 50 do 80 dana) i anestrus (u trajanju od 80 do 240 dana) (EVANS i COLE, 1931., ROBINSON i NOAKES, 2019.). Prvo tjeranje javlja se u dobi od šest do 14 mjeseci, a na pojavu tjeranja značajno utječe veličina pasmine (CONCANNON, 2011.).

Spolni ciklus u kuja, kao i u ostalih sisavaca, reguliran je osovinom hipotalamus – hipofiza – spolne žlijezde (CONCANNON, 2011.). Prije proestrusa dolazi do porasta pulsnog otpuštanja gonadotropin oslobađajućeg hormona (GnRH) iz hipotalamusa koji potiče otpuštanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) iz prednjeg režnja hipofize. Porast razine hormona hipofize potiče rast folikula i potiče stvaranje steroidnih hormona u spolnim žlijezdama (ENGLAND i sur., 2009., CONCANNON, 2011.). Stalni rast estradiola tijekom proestrusa uzrokuje nagli porast LH nakon čega slijedi ovulacija za 48 do 60 sati. U kuja, različito od mnogih sisavaca, sazrijevanje oocite odvija se u donjem dijelu jajovoda dva dana nakon ovulacije (CONCANNON, 2011.).

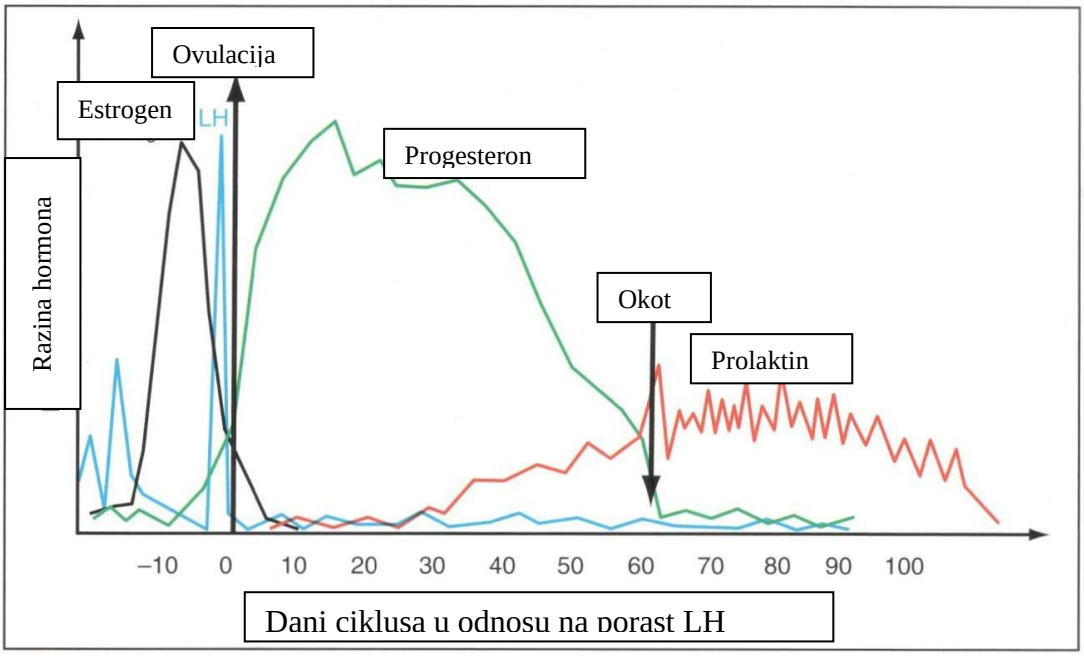
Kuje ovuliraju pri razini serumskog progesterona od pet do 10 ng/ml. Koncentracija serumskog progesterona raste na >25 ng/ml tijekom tri do četri tjedna. Nakon porasta, razina progesterona ostaje konstantna sljedećih sedam do 14 dana, nakon čega slijedi postepeni pad. U gravidnih kuja, vrijednosti serumskog progesterona naglo padaju ispod vrijednosti od 2 ng/ml, 24 do 48 sati pred okot, što je inducirano sekrecijom $PGF_{2\alpha}$ (BECHER i sur., 2010.). Proestrus počinje s vanjskim znakovima povećane estrogenizacije koja je vidljiva kao natečenje stidnice, često praćeno s iscjetkom koji sadrži feromone (metil p-hidroksibenzoat), seroznu tekućinu s cijelim ili raspadnutim eritrocitima i hemoglobinom, koji potječu iz maternice (CONCANNON, 2011.). Vaginoskopski, sluznica rodnice je edematozna, mijenjajući boju iz roze u bijelu s dubokim naborima sluznice (FOLNOŽIĆ, 2009., ANTONOV, 2017.). Iz razmaza brisa sluznice rodnice vidljive su promjene epitelnih stanica, od pretežno bazalnih stanica koje su često praćene s različitim brojem neutrofila do pretežito malih intermedijarnih stanica, velikih intermedijarnih stanica i na kraju velikih orožnjalih

stanica, čiji postotak u razmazu može biti 98-100%. U kasnom proestrusu više nisu vidljivi neutrofili zbog nemogućnosti prolaska kroz zadebljali epitel rodnice. Razina estradiola u serumu tijekom proestrusa raste od pet do 15 pg/ml do 40 do 120 pg/ml. Orožnjavanje stanica sluznice rodnice postiže svoj maksimum jedan do šest dana prije porasta LH. Kod prijelaza u estrus, mijenja se ponašanje kuje prema mužjaku iz agresivnog u prihvaćajuće ponašanje, koje se javlja jedan do tri dana nakon najviše razine estradiola i na dan najviše razine LH. Hormonalno, proestrus završava s naglim rastom i padom LH (CONCANNON, 2011.).

Estrus traje pet do 10 dana (u prosjeku devet dana). U ovoj fazi ciklusa kuja prihvaća mužjaka za parenje. Prema stanicama sluznice rodnice nije vidljiv prijelaz iz proestrusa u estrus, ali je vaginoskopski vidljiva promjena u naborima sluznice, koji su manje edematozni. Vrijednosti estradiola u serumu se smanjuju, od najviše koncentracije koja se postiže u kasnom proestrusu na niže vrijednosti (10 do 20 pg/ml). Razina serumskog progesterona naglo raste iznad 1 do 3 ng/ml za vrijeme porasta LH i nastavlja svoj rast do vrijednosti od 10 do 25 ng/ml do desetog dana estrusa ili nedugo nakon kraja estrusa. Hormonalno, estrus prestaje šest do 11 dana (u prosjeku 8 dana) nakon porasta i pada LH. Klinički, kraj estrusa vidljiv je kao prestanak maksimalnog orožnjavanja stanica sluznice rodnice. U razmazu su ponovno vidljivi neutrofili, koji zbog stanjivanja stijenke epitela mogu ponovno prijeći u lumen rodnice (CONCANNON, 2011.). Diestrus je lutealna faza spolnog ciklusa koja slijedi nakon estrusa i u kojoj serumski progesteron dostiže najviše vrijednosti (15 do 80 ng/ml, između 20. i 35. dana ciklusa) nakon čega vrijednosti padaju do vrijednosti od 1 ng/ml, 55. do 90. dana ciklusa (prosjek 70 dana). Vrijednosti estradiola variraju (od 15 do 30 pg/ml), više su u sredini lutealne faza te prema kraju diestrusa vrijednosti estradiola padaju (CONCANNON, 2011.).

Anestrus je faza cikusa u trajanju od 18 do 20 tjedana. Anestrus je bitan period u kojem dolazi do oporavka endometrija, a smatra se da minimalno mora trajati sedam tjedana nakon pada serumskog progesterona ispod 1 do 2 ng/ml (CONCANNON, 2011., ROBINSON i NOAKES, 2019.). Vaginalnom citologijom nalazimo manju količinu bazalnih stanica i umjerenu količinu neutrofila. Vaginalna sluznica je tanka, crvene je boje i vidljive su kapilare. Vrijednosti serumskog estradiola variraju, uglavnom su niske (5 do 10 pg/ml). Vrijednosti LH su uglavnom bazalne (manje od 1 do 2 ng/ml) s povremenim porastom od 3 do 30 ng/ml u vremenskim intervalima od sedam do 18 sati. FSH je visok (50 do 400 ng/l, srednja vrijednost 140) s povremenim porastima vezanim uz porast LH. Razina progesterona je ispod 1 ng/ml (CONCANNON, 1993., CONCANNON, 2011.). Prema završetku anestrusa dolazi do pojačanog pulsnog izlučivanja GnRH pod djelovanjem endogenih dopaminergičkih supstanci.

Navedeno stimulira izlučivanje bazalnog FSH i početak rasta antralnih folikula (OKKENS i KOOISTRA, 2006., ROBINSON i NOAKES, 2019.).



Slika 3. Hormonalne promjene tijekom spolnog ciklusa kuje.

Preuzeto i prilagođeno iz: ENGLAND, 2011.

2.10.2. Skotnost

Skotnost (gravidnost) traje 64±1 dan. Najranija pouzdana ultrazvučna dijagnostika skotnosti u kuja moguća je 17. dan nakon porasta razine LH (ENGLAND i sur., 1990., YEAGER i CONCANNON, 1990.; YEAGER i sur. 1992.; ENGLAND i YEAGER, 1993.). Relaksin se luči iz posteljice i mjerljiv je od najranije 19. do 21. dana skotnosti. S tumačenjem relaksina teba biti oprezan s obzirom da se nakon rane embrionalne smrti i dalje može izlučivati (CONCANNON i sur., 1989.; VERSTEGEN-ONCLIN i VERSTEGEN, 2008.; LOPATE, 2012.).

U periodu od 17. do 30. dana nakon porasta LH zametak linearno raste 1 mm u danu, a nakon navedenog perioda nastavlja s eksponencijalnim rastom. U slučaju usporenog rasta ploda ili u slučaju kada razvoj struktura ploda nije zabilježen dva ili više dana, postoji mogućnost da dolazi do resorpcije ili pobačaja ploda.

Pod pojmom resorpcija smatra se smrt zametka i resorpcija tekućinskih komponenta vezanih uz skotnost, a javlja se kod uginuća zametka/ploda u periodu do 25. do 35. dana nakon ovulacije. Pobačaj u ranoj fazi gravidnosti je teško dijagnosticirati, s obzirom na izostanak pouzdanog testa koji potvrđuje skotnost tom periodu (FRESHMAN, 2009.).

Ultrazvučnom dijagnostikom embrionalne resorpcije, vidljivo je smanjenje veličine zametka, plodna tekućina postaje hipoehogena i ne bilježe se otkucaji srca. Zametak se počinje razlagati, gestacijska vreća kolabira, a maternica postaje hipoehogena u području resorpcije. U većini slučajeva, gubitak tekućine je postepen i traje dva do tri dana (ENGLAND i ALLEN, 1989.).

Uginuće plodova nakon 35. dana od ovulacije, odnosno prije termina okota, rezultira pobačajem ili izbacivanjem mrvih plodova (ENGLAND, 1998.), iako u ovom periodu moguća je i resorpcija plodova. Smrt ploda u kasnoj gravidnosti može rezultirati mumifikacijom (FRESHMAN, 2009.). Na dan pobačaja, zamjetna je povećana ehogenost plodne tekućine i zadebljanje maternične stijenke oko fetusa. Volumen amnionske tekućine se smanjuje, prestaju otkucaji srca fetusa, fetalno tkivo može biti nejasno zbog ehogenog materijala koje pluta u amnionskoj i alantoisnoj šupljini. Obično izbacivanje fetusa prate i fetalne ovojnice (ENGLAND, 1992.).

Od 25. do 26. dana nakon porasta LH do okota ultrazvučnom pretragom moguće je praćenje vitalnosti i stresa ploda. Do fetalnog distresa dolazi zbog hipoksije (koja se može javiti i prilikom okota), što se očituje se kao usporavanje broja otkucaja srca. Fiziološki broj otkucaja srca je 2-3 puta veći od broja otkucaja kuje (220–240 otkucaja u minuti). Broj otkucaja u rasponu od 180 do 220 daje pretpostavku da je plod u blagom distresu. Broj otkucaja srca niži od 180 otkucaja u minuti smatra se opasnim za život ploda (VESTERGEN i sur., 1993., ENGLAND, 1998., ZONE i WANKE, 2001., LOPATE, 2008.).

Česti ultrazvučni pregledi plodova mogu biti neophodni u svrhu ranog otkrivanja problema. U vrijeme termina okota, normalni broj otkucaja srca ploda je oko 200 otkucaja u minuti. Carski rez je neophodan kada je prisutan manji broj otkucaja srca (<150) (LINDE-FORSBERG i ENEROTH, 2000., SCHWEIZER i MEYERS-WALLEN, 2000., WYKES i OLSON, 2003.).

Prvi znak gravidnosti je otkrivanje gestacijske vreće (ŠEHIĆ i sur., 2006.). Ultrazvučnom pretragom korionska šupljina (gestacijska vreća) vidljiva je 20. dan nakon porasta razine LH. U tom periodu, gestacijska vreća je sferična anehogena struktura veličine oko 2 mm u promjeru, obuhvaćena tankim, hiperehogenim stijenkama. Stijenka maternice koja okružuje gestacijsku vreću zadebljana je i ehogenija od područja stjenke maternice između zametaka (ENGLAND, 1998.).

Radiografija se može koristiti za potvrđivanje gravidnosti i određivanje starosti ploda od 45. dana nakon porasta LH. Fetalna mineralizacija najbolje je vidljiva nakon 45. dana od ovulacije. Koristeći rendgenološku dijagnostiku u praćenju tijeka gravidnosti tijekom zadnja dva tjedna skotnosti možemo pouzdanije pratiti sazrijevanje ploda. Lubanja ploda i kralježnica postaju vidljivi od 44. do 46. dana nakon porasta razine LH, zdjelica ploda od 53. do 57. dana nakon porasta LH, a zubi ploda od 58. do 61. dana. Rendgenološkom pretragom vidljivi živi plodovi normalno leže u neutralnom ili poluflektiranom položaju. Na smrt ploda može se posumnjati kod nalaza neprirodnog položaja ili može biti vidljivo raspadanje (preklapanje kostiju glave, kolaps kralježnice i izraženo zakrivljeni položaj može biti prisutan 48 sati nakon uginuća ploda). Također, može biti vidljiva demineralizacija kostiju te mumifikacija, što se očituje kao gusti, kompaktni plod. Nakupina plina između ploda ili unutar ploda (porijeklom od ploda ili majke) javlja se 6 sati nakon smrti ploda (CONCANNON i RENDANO, 1983., RENDANO, 1983., KNELLER, 1986., RIVERS i JOHNSTON, 1991., LOPATE, 2012.).

2.10.3. Određivanje termina okota

U literaturi je opisano nekoliko metoda određivanja termina okota, s ciljem smanjenja odnosno preveniranja uginuća štenadi (KUTZLER i sur., 2003., KIM i sur, 2007., BECCAGLIA i sur. 2008., LOPATE, 2012.).

Trajanje gravidnosti u kuja je varijabilno i iznosi 58 do 71 dan, ako kao prvi dan gravidnosti uzimamo dan kada je kuja parena (LUVONI i BECCAGLIA, 2006.). Mjerenjem vrijednosti serumskog progesterona prije ovulacije, kako bi utvrdili njegov predovulatorni porast ($\geq$ 1,5 ng/ml), možemo odrediti nulti dan gravidnosti i time točnije predvidjeti očekivano vrijeme okota. Prvi dan gravidnosti smatra se prvi sljedeći dan kada progesteron iznosi $\geq$ 3,0 ng/ml. Predviđeni termin okota je 65. dan od predovulatornog porasta progesterona. Točnost ovakvog predviđanja dana okota s intervalom od $\pm$1, $\pm$2 i $\pm$3 dana je 67%, 90% i 100% (KUTZLER i sur., 2003.).

Ultrazvučna mjerenja ploda i struktura koje okružuju plod (fetometrija) omogućuju nam procjenu gestacijske dobi i termina okota kroz period od četvrtog do devetog tjedna skotnosti (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.). Koristeći ultrazvučnu fetalnu biometriju možemo pratiti fetalni rast i procijeniti duljinu skotnosti (LUVONI i GRIONI, 2000., BECCAGLIA i LUVONI, 2006., BECCAGLIA i sur. 2008.), odnosno u periodu od 19. do 21. dana nakon porasta LH ultrazvučnom pretragom možemo pristupiti potvrdi gravidnosti i procjeni starosti ploda. U literaturi je opisan širok raspon ultrazvučnih mjerenja ploda, a jednadžbe dobivene iz krivulja rasta specifičnih struktura ploda daju nam osnovu za utvrđivanje predviđenog termina okota (LUVONI i GRIONI, 2000., KUTZER i sur., 2003., LUVONI i BECCAGLIA, 2006., LOPATE, 2008.).

Unutarnji promjer korionske šupljine (*eng. diameter of the inner chorionic cavity*, ICC), najčešće je korišten ultrazvučni parametar za predviđanje dana okota tijekom rane skotnosti (LUVONI i BECCAGLIA, 2006.). Slična točnost u rezultatima dobiva se mjerenjem promjera ICC u četvrtom i petom tjednu skotnosti (± 1 dan, 81% prema 67,7%, ±2 dana, 93.1% prema 85.9%), uzimajući kod mjerenja srednju vrijednost dva transverzalna i ortogonalna promjera od jednog kraja trofoblasta do drugog (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.).

Kada je fetalni kostur vidljiv (nakon 35. dana), mjeri se razmak između dvije tjemene kosti glave (*eng. biparietal diametar*, BPD), u trenutku kada su tjemene kosti ploda paralelne (KUTZER i sur., 2003.). Mjerenje promjera tjemenih kostiju često se koristi za predviđanje termina okota u drugoj polovici gravidnosti, iz razloga što je rast značajno povezan s gestacijskom dobi, a mjerenje se lako izvodi (LUVONI i BECCAGLIA, 2006., BECCAGLIA i sur., 2008.).

Točnost od ±1 dana na osnovu mjerenja BPD je slična petog i šestog tjedna skotnosti (78.6% prema 78.9%), gdje je značajan pad u točnosti predviđanja zabilježen u sedmom i osmom tjednu skotnosti, u odnosnu na šesti tjedan. Bez obzira na pad točnosti u predviđanju dana okota na osnovu mjerenja biparijetalnog dijametra, točnost od ±1 i ±2 dana je konstantna (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.).

Prilikom ultrazvučne pretrage, ICC i BPD mjere se na minimalno dva ploda. Računa se srednja vrijednost podataka, a predviđeni dan okota dobiva se korištenjem formula (LUVONI i GRIONI, 2000., BECCAGLIA i sur., 2008.). Primjena navedenih formula daje negativne vrijednosti, koje predstavljaju broj dana do okota. Predviđanje se smatra točnim kada razlika između stvarnog i predviđenog termina za okot iznosi ±1 ili ± 2 dana. Potrebno je korištenje specifičnih jednadžbi za male i srednje velike kuje (LUVONI i BECCAGLIA, 2006.,

BECCAGLIA i sur., 2008.) i korištenje čimbenika korekcije za gigantske pasmine (KUTZLER i sur., 2003.).

Precizno određivanje očekivanog termina štenjenja potrebno je zbog planiranja asistencije prilikom okota ili elektivnog carskog reza kod potpune zrelosti ploda. Nekoliko drugih okolnosti zahtijevaju točnu procjenu fetalnog rasta, kao što su visokorizične skotnosti koje zahtijevaju medicinsku intervenciju ili okot do kojeg dolazi nakon ili prije termina, pa zahtjeva točnu dijagnostiku (LOPATE, 2008.).

Postoji jaka korelacija između vrijednosti serumskog progesterona i ultrazvučnih metoda u predviđanju termina okota (KUTZLER i sur., 2003a; KUTZLER i sur., 2003b). Kod određivanja razine serumskog progesterona, treba uzeti u obzir variranja u vrijednostima progesterona tijekom dana (STEINETZ i sur., 1990.). Također, dostupno je kvantitativnim i semikvantitativnim metodama određivanje razine serumskog progesterona, a prednost uvijek treba dati kvantitativnim metodama (HOSPES i sur., 2004.).

Radioimunološka metoda (eng. *radio immunoassays* – RIA) smatra se 'zlatnim standardom' u određivanju razine progesterona. Zbog negativnog utjecaja uporabe radioaktivnog materijala, ograničavanja korištenja navedene metode na ovlaštene laboratorije, problema s infektivnim otpadom i visokim troškovima izvedbe testa, nastala je potreba za pronalaskom nove, podjednako točne metode (HANNON i sur., 2004., CHAPWANYA i sur., 2008.).

Usporedbom imunoenzimskog testa s fluorescentnom detekcijom (eng. *enzyme lynked fluorescent assay*, ELFA) i RIA metode dobivamo vrijednosti koje se mogu usporediti u cijelom rasponu klinički značajnih rezultata razine progesterona. Kod uzoraka vrijednosti iznad 2 ng/ml javlja se odstupanje u ELFA rezultatima u usporedbi s RIA metodom koje ima tendenciju rasta s rastom vrijednosti progesterona. Mjerenje progestreona ELFA metodom za određivanje vremena ovulacije i za predviđanje termina okota daju brze i pouzdane rezultate (BRUGGER i sur., 2011.).

Prilikom uzorkovanja, Krv mora biti vađena u običnu epruvetu bez aktivatora grušanja ili gela za odvajanje seruma, pohranjena na +4 ºC a serum mora biti odvojen unutar 12 sati. Počevši u ranom proestrusu, serumski progesteron mora biti mjeren barem svaki drugi dan (od nultog dana), do vrijednosti ≥5 ng/ml. Vaginalna citologija mora biti tumačena na isti dan kao i određivanje razine serumskog progesterona (KUTZLER i sur., 2003.a., KUTZLER i sur., 2003.b.).

U zadnjem tjednu gravidnosti, preporuka je praćenje rektalne temperature kuje, pregled stidnice i provjera prisutnog iscjetka kao i prisutnosti mlijeka nakon pritiska mliječne žlijezde (SCHWEIZER i MEYERS-WALLEN, 2000.).

Nagli pad tjelesne temperature moguće je bilježiti 8 do 24 sata prije okota, što je 10 do 14 sati nakon što koncentracija progesterona u perifernoj plazmi padne ispod 2 ng/ml (LINDE FORSBERG, 2015.). Navedene promjene u rektalnoj temperaturi pokazatelj su razgradnje žutog tijela i predstojećeg okota. U slučaju primjene progesteronskih implantata, rektalna temperature se ne snižava i ne dolazi do okota. Pad tjelesne temperature obično prethodi okotu 10 do 24 sata. Temperaturni pad također je opisan prije induciranog pobačaja sa $PGF_{2\alpha}$ (CONCANNON i YEAGER, 1990.).

Stupanj pada tjelesne temperature varira od 1 °C do 3.5 °C, što ovisi i o odnosu površine i volumena tijela. Kod kratkodlakih, minijaturnih pasmina vrijednost tjelesne temperature može pasti do 35 °C, u pasminama srednje veličine do 36°C, a u kuja gigantskih pasmina ili kuja s debelim slojem dlake rijetko pada ispod 37°C. U slučaju prisutne atonije maternice, izraženiji pad u tjelesnoj temperaturi može izostati (CONCANNON i sur., 1989., CONCANNON i YEAGER, 1990.).

Progesteron je termogeni hormon. Do pada u temperaturi dolazi zbog nemogućnosti kompenzatornih mehanzama da reguliraju snižene vrijednost temperature do kojih dolazi zbog pada vrijednosti progesterona. Pošto je pad temperature prolazna pojava, može biti neprimjećena od strane vlasnika kuje.

Različiti autori navode različiti broj potrebnih mjerenja rektalne temperature. LINDE FORSBERG (2015.), navodi da u svrhu što točnije procjene predporođajnog pada tjelesne temperature, mjerenja bi trebala biti rađena svakih 1 do 2 sata, odnosno dovoljno često da se zabilježi trenutak ponovnog porasta, a provode se sve dok traje navedeni pad.

LOPATE (2012.) navodi da bi temperatura trebala biti mjerena svakih 8 sati da pad bude zabilježen. Nakon pada temperatura se vraća na normalne vrijednosti, a prvi stadij okota počinje 12–36 sati nakon pada progesterona ispod 2 ng/ml.

Brzina pada progesterona pred okot ovisi i o starosti kuje, odnosno u kojoj dobi prvi puta ima okot (GRACIN i sur., 2017.). Autori navode da je mjerenjem rektale tempearture četiri puta dnevno s usporedbom pada progesterona, moguće posumnjati na distociju (GRACIN i LOJKIĆ, 2016.)

Mjerenjem vaginalne tjelesne temperature (GEISER i sur., 2014.) uz pomoć uređaja apliciranog u rodnicu, programiranog da bilježi vrijednosti temperature svakih 10 minuta počevši od 56. do 61. dana nakon utvrđene ovulacije, utvrđena je točnost početka štenjenja od

62.1 ± 1.8 dana. U zadnjih 24 sata pred okot, srednja temperatura je bila niža (37.3 ± 0.3 °C) od vaginalne temperature izmjerene 24 do 48 sati (37.6 ± 0.2 °C) i 49 do 72 sata (37.7 ± 0.1 °C) prije okota.

2.10.4. Okot kuje

Okot kuje fiziološki je proces. Prema novijim istraživanjima (TAVERNE i NOAKES, 2019.) nema objavljenih podataka o izlučivanju fetalnog kortizola tijekom kasne gestacije, a porast kortizola u kuja u perifernoj cirkulaciji (osam do 24 sata pred porođaj) vezan je za stes kuje pred štenjenje i početne kontrakcije maternice. Koncentracija progesterona počinje postepeno padati od 30. dana gestacije, dok se nagli pad događa između 12 i 40 sati prije okota prvog šteneta (CONCANNON i sur., 1975, BAAN i sur., 2008). Tijekom 48 sati prije okota dolazi do porasta metabolita prostaglendina (PG). Stvaranje PG potječe iz stanica trofoblasta ploda u posteljici koje reguliraju i sintezu COX-2 enzima (regulira sintezu PG) neposredno pred porođaj (KOWALEWSKI i sur. 2010). Otpuštanje PG uzrokuje razgradnju žutog tijela ali je također dokazano da su i drugi procesi u žutom tijelu (povećani broj makrofaga, pojava enzima apoptoze i značajno niža regulacija steroidogenze) uključeni u razgradnju žutog tijela kada je prisutan pad progesterona (KOWALEWSKI, 2014.).

Do početka okota dolazi nakon naglog pada serumskog progesterona ispod 2 ng/ml, dok razina estrogena ostaje nepromjenjena (CONCANNON i sur., 1989., VERSTEGEN-ONCLIN i VERSTEGEN, 2008). Okot počinje 24 do 36 sati nakon promjene odnosa estrogen : progesteron, a pad progesterona je uzrokovan naglim porastom sinteze $PGF_{2\alpha}$ iz posteljice ploda (LOPATE, 2012.).

Prolaskom ploda i plodovih ovojnica ispunjenih tekućinom stimuliraju se senzorni receptori grlića maternice i rodnice što rezultira otpuštanjem oksitocina u drugom stadiju okota. Relaksin, koji se sintetizira u jajnicima i moguće u posteljici i maternici gravidnih kuja, postepeno raste u zadnjoj trećini gravidnosti i uzrokuje opuštanje zdjeličnog mekog tkiva i genitalnog trakta, što također omogućava prolaz ploda kroz porođajni kanal (STEINETZ i sur., 1990., JACKSON, 2004.).

Prolaktin u serumu kuje raste u drugoj polovici skotnosti, a najznačajniji rast je zabilježen 32 sata prije okota kada naraste s 40 ± 7 ng/ml na 117 ± 24 ng/ml. Navedeni rast vrijednosti prolaktina zadnjih nekoliko dana gravidnosti vezan je za pad koncentracije progesterona u istom periodu (CONCANNON i sur., 1977., BAAN i sur., 2008.) i nije poznato utječe li njegov porast na okot kuje. Nekoliko radova ukazuje da povišena razina oksitocina u kuje nije

vezana za početak okota jer su povišene vrijednosti zabilježene već kada je počeo stadij istiskivanja ploda (OLSSON i sur., 2003., KLARENBEEK i sur., 2007., TAVERNE i NOAKES, 2019.).

2.10.5. Teški okot (distocija)

Teški porod (distocija) je nemogućnost izbacivanja svih plodova kroz porođajni kanal tijekom okota (JOHNSTON i sur., 2001.b; ROMAGNOLI, 2007.).

Uzroci distocije mogu biti na razini kuje i/ili ploda. Do distocije majčinog podrijetla može doći zbog primarne ili sekundarne atonije maternice, anatomskih nepravilnosti zdjelice, vaginalnih suženja ili prisutnosti septuma, prevelike količine masnog tkiva u okolici rodnice, rupture ošita, ingvinalne hernije, torzije ili rupture maternice ili zbog nelagode ili straha kuje (DARVELID i LINDE-FORSBERG, 1994., LOPATE, 2012.).

Do distocije na razini ploda dolazi zbog nepravilanog položaj ploda prilikom okota ako je prisutan plod patološki promjenjen, prevelik ili uginuo (DARVELID i LINDE-FORSBERG, 1994., ENEROTH i sur., 1999., JOHNSTON i sur., 2001.b, ROMAGNOLI, 2007., LOPATE, 2012).

Indikacije za carski rez su: atonija maternice, opstruktivne anomalije zdjelice, nepravilni položaj ploda koji nije moguće ispraviti, smrt ploda, preveliki plod i fetalni distres (broj otkucaja srca ploda manji od 150 otkucaja u minuti ili vidljivo kretanje crijeva fetusa ultrazvučnom metodom) (LINDE-FORSBERG i ENEROTH, 2000., SCHWEIZER i MEYERS-WALLEN, 2000., WYKES i OLSON, 2003.).

2.10.6. Uzroci uginuća štenadi u perinatalnom i neonatalnom razdoblju

U perinatalnom razdoblju smrtnost u pasa je relativno visoka i iznosi 17% do 26% legla (GILL, 2001., INDREBØ i sur., 2007.). Prema definiciji, perinatalna uginuća obuhvaćaju mrtvorođenja i uginuća u ranom neonatalnom razdoblju, odnosno razdoblju unutar prvog tjedna života (GILL, 2001.). Neonatalno razdoblje u pasa traje od okota do tri tjedna života šteneta (INDREBØ i sur. 2007.). Rizik pojave perinatalne smrtnosti na razini legla raste s veličinom legla i dobi kuje. Također, broj legala ima značajan utjecaj, najviši rizik perinatalne smrtnosti je u prvom leglu (TØNNESSEN i sur., 2012.)

Od uzroka uginuća treba uzeti u obzir izrazitu osjetljivost štenadi u neonatalnom razdoblju. Osjetljivi su na hipotermiju, hipoglikemiju i dehidraciju. Zbog nedovoljno

razvijenog termoregulacijskog sustava ne mogu izazvati perifernu vazokonstrikciju ili se zaštititi od niske temperature drhtanjem. Jetra šteneta ne stvara dovoljne energetske rezerve, a rizik od dehidracije prisutan je zbog nedovoljno razvijene funkcije bubrega. Neonatalna štenad ima visoki postotak tjelesne tekućine (82%), a zbog velikih gubitaka tekućine kroz pluća i kožu, dodatno su skloniji dehidraciji (GUNN-MOORE, 2006., JOHNSTON i sur., 2001.).

MILA i sur. (2017.) opisuju pregled štenadi u prvih osam sati nakon okota. Ocijenu APGAR-a 6 ili ispod 6 povezuju s visokim rizikom uginuća u prva 24 sata, a smanjenu razinu glukoze ($\leq$ 92 mg/dl) povezuju s višim rizikom uginuća do 21. dana starosti štenadi.

Na razini šteneta, do uginuća najčešće dolazi zbog niske porođajne težine, urođenih malformacija ili pothranjenosti. Također, bitni uzroci uginuća su i okolišni uzorci i prisutnost infekcija (GILL, 2001., DAVIDSON, 2003., INDREBØ i sur., 2007., MÜNNICH, 2008.)

MILA i sur. 2014. navode kao primarni uzrok uginuća živorođene štenadi – zarazne bolesti, i to bakterijske infekcije sa *Escherichia colli, Staphylococcus sp. i Streptococcus sp* i u prvom tjednu života virusna infekcija s CaHV-1 (MUNNICH, 2008., DAHLBOM i sur., 2009.).

Od infektivnih uzročnika, diferencijalno dijagnostički, kod uginuća štenadi treba obratiti pozornost, osim na CHV-1, i na druge virusne (korona virus, parvo virus, zarazni hepatitis pasa, štenećak), bakterijske (*E. Coli, Streptococcus sp., Mycoplasma sp., Ureaplasma sp., Campylobacter sp., Brucella canis, Leptospira sp*.) i parazitarne uzročnike (toksoplazmoza, neosporoza, invazija sa *Toxocarom canis* ili *Ankylostomom caninum*), premda navedeni uzročnici mogu imati sinergističko djelovanje s CHV-1 (RONSSE i sur., 2003.).

Štenad se rađa s niskom razinom ili bez gama globulina (BOUCHARD i sur., 1992.). Dovoljan prijenos zaštitnih protutijela putem kolostruma smatra se presudnim za preživljavanje i kontrolu zaraznih bolesti u prasadi (VALLET i sur., 2013.), a razina imunoglobulina G (IgG) u krvi novorođene teladi je rutinski kriterij za procjenu kvalitete prijenosa pasivnog imuniteta (BEAM i sur., 2009.). U štenadi je dokazana jaka povezanost između prijenosa pasivnog imuniteta (mjerenjem koncentracije IgG u serumu u dobi od 2 dana) i uginuća štenadi (MILA i sur., 2014.)

Predisponirajući čimbenik za razvoj septikemije u štenadi je upala maternice u kuje, u slučaju produljenog okota, pa postoji mogućnost duljeg izlaganja mikroorganizmima iz maternice ili porođajnog kanala. Štenad je također sklonija sepsi ako je držana u kontaminiranom okolišu, pogotovo zbog nerazvijenosti imunološkog sustava. I kada je štenad

smještena u dobrim uvjetima veterinarskih klinika, uvijek postoji mogućnost infekcija (POFFENBARGER i sur., 1991.).

Za razvoj CHV-1 u štenadi u prva 3 tjedna života pogoduje činjenica da je optimalna temperatura za inkubaciju herpes virusa od 35 °C do 36 °C (CARMICHAEL i sur., 1965., GREEN i CARMICHAEL, 2006.), a navedena temperatura odgovara rektalnoj temperaturi kod novorođene štenadi i u prvom tjednu života koja je od 35 °C do 37,2 °C (LAWLER, 2008.).

Dijagnostika uzroka uginuća u neonatalnoj dobi, pa i nadalje, predstavlja veliki izazov. Do danas je objavljen niz znanstvenih i stručnih radova u kojima se opisuje vrlo visok postotak perinatalnih i neonatalnih gubitaka. Navedeno upućuje na neophodnost novih, kontinuiranih istraživanja sa ciljem utvrđivanja adekvatnih metoda dijagnostike te prevencije uginuća u navedenom razdoblju.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na stalne potvrde prisutnosti CaHV-1 u Europi (ne samo na području sjeverne i zapadne Europe, nego prema najnovijem istraživanjima i u Italiji i Grčkoj), cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost i proširenost CaHV-1 u populaciji pasa na području Republike Hrvatske.

Serološka dijagnostika CaHV-1 predstavlja značajan problem. Očekivani znanstveni doprinos istraživanja je činjenica da se prvi puta omogućuje iznalaženje najprikladnijih seroloških i molekularnih metoda dijagnostike CaHV-1 u epizootiološkim uvjetima Republike Hrvatske, ali i šire.

Nadalje, epizootiologija, čimbenici rizika te značenje ovog patogena u reprodukciji pasa nepotpuno je poznat i nedovoljno istražen kako u Republici Hrvatskoj tako i u svijetu.

Naglasak istraživanja je bio na psima koji se drže u uzgajivačnicama. U uzgajivačnicama žive psi uglavnom iste pasmine, često su jedinke u srodstvu i u istim uvjetima držanja, te se provode iste mjere opće profilakse i imunoprofilakse. Zbog horizontalnog i vertikalnog načina širenja u gustoj populaciji moguća je i veća zastupljenost virusa što omogućava lakše praćenje kretanja virusa. Navedenim pristupom istraživanju, na temelju prikupljenih epizootioloških podataka, bilo je moguće utvrđivanje utjecaja pojedinih epizootoloških čimbenika na unos, širenje i kruženje bolesti među psima.

Kod skupnog držanja pasa u uzgajivačnicama bilo je moguće i praćenje kuja i rasplodnjaka u različitim fazama spolnog ciklusa uključujući i praćenje gravidnosti, okota i zdravstvenog statusa štenadi do tri tjedna starosti. Na osnovu kliničkog nalaza i rezultata seroloških i molekularnih metoda pristupilo se utvrđivanju poveznice serološkog statusa jedinke i fiziologije i patologije rasplođivanja u oba spola.

Kako je zbog ograničene uspješnosti imunoprofilakse, provođenje mjera opće profilakse osnova kontrole i suzbijanja infekcije CaHV-1 u pasa, rezultati ovog istraživanja mogu ukazati na najvažnije kritične točke uzgoja i držanja pasa te se preventivne mjere mogu primjenjivati ciljano. Analizom čimbenika rizika i utjecaja infekcije CaHV-1 na reprodukciju u pasa dobivaju se nove spoznaje o herpesvirusnim infekcijama općenito. Ovo ima veliki znanstveni značaj jer se herpesvirusne infekcije pojavljuju ne samo u pasa nego i u drugih vrsta životinja te kod ljudi.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Plan istraživanja i plan uzorkovanja

Ovim istraživanjem bilo je obuhvaćeno 25 uzgajivačnica različitih pasmina pasa s različitih područja Republike Hrvatske. Uzorci korišteni u istraživanju prikupljeni su u razdoblju od listopada 2013. godine do studenog 2017. godine. Osnovni kriterij odabira uzgajivačnice bila je dostupnost životinja za uzorkovanje i neprovođenje sustavne imunoprofilakse herpesvirusne infekcije pasa. Prije uzorkovanja, svaki je vlasnik uzgajivačnice upoznat s načinom uzorkovanja i svrhom istraživanja te je potpisao suglasnost o uzimanju uzoraka i korištenju dobivenih podataka.

U prvoj fazi istraživanja, prikupili su se epizootiološki podaci, koristeći za ovu svrhu načinjen epizootiološki upitnik, te se provelo uzorkovanje u cilju procjene izloženosti životinja CaHV-1. Uzorkovanje kuja u ovom dijelu istraživanja bilo je načinjeno neovisno o fazi spolnog ciklusa. U mužjaka uzorci su uzimani u razdoblju kada se u uzgajivačnici nalazila kuja u proestrusu ili estrusu.

Kod uzorkovanja uzimao se uzorak seruma. Na dan uzimanja seruma, uziman je obrisak sluznice nosa i ovisno o spolu jedinke, obrisak rodnice ili prepucija.

Prilikom uzimanja svakog uzoraka u cilju utvrđivanja općeg stanja životinje načino se i opći klinički pregled životinje.

U uzgajivačnicama u kojima su ustanovljeni reproduktivni poremećaji načinilo se dodatno uzorkovanje. Pod reproduktivnim poremećajima smatrala se sva simptomatologija koja bi mogla imati poveznicu sa CaHV-1: nemogućnost koncepcije, resorpcija plodova i pobačaj, uginuća štenadi do tri tjedna starosti, mala legla i neplodnost kod mužjaka.

Pod dodatnim uzorkovanjem podrazumjevalo se prikupljanje uzoraka seruma kuja u više faza spolnog ciklusa s pratećim obriscima sluznice nosa, rodnice te općim kliničkim pregledom životinje. Faza spolnog ciklusa kuje određivana je na temelju: anamnestičkih podataka (datum početka tjeranja kuje, parenja, okota), ginekološkog nalaza te tumačenjem citološkog nalaza brisa rodnice.

4.2. Epizootiološki podaci

Kako je već ranije rečeno epizootiološki podaci prikupljani su koristeći za ovu svrhu načinjen upitnik.

4.2.1. Epizootiološki upitnik - podaci na razini uzgajivačnice

Na razini uzgajivačnice prikupljeni su sljedeći podaci: pasmine pasa koji se drže za uzgoj, namjena pasa (izložbe, lov, službeni psi), veličina uzgajivačnice, način držanja pasa, način provođenja čišćenja te podaci o zdravstvenom statusu životinja.

Prema namjeni, uzgajivačnice su bile podijeljene na:

1. uzgajivačnice izložbenih pasa: one uzgajivačnice u kojima minimalno dva psa godišnje idu na izložbe, pri čemu su u uzgajivačnici u izravnom kontaktu s drugim psima
2. uzgajivačnice pasa namjenjenih za lov: one uzgajivačnice u kojima većina odnosno svi psi idu redovito u lov
3. uzgajivačnice službenih psa: psi iz ovih uzgajivačnica nikada nisu bili na izložbi niti u lovu, a u prve dvije godine života su bili povrgnuti svakodnevnoj dresuri.

Veličina uzgajivačnice određena je prema broju držanih pasa, te su uzgajivačnice kategorizirane kao:

1. male (do deset pasa)
2. velike (deset i više pasa).

Ovaj se broj odnosio samo na odrasle jedinke koje trajno žive u uzgajivačnici, a ne na broj pasa kada je prisutno i leglo.

Podaci o uvjetima držanja pasa i provođenju čišćenja podrazumjevali su:

1. način držanja pasa: u boksevima, pojedinačno ili u skupinama, u kući itd.
2. način i učestalost provođenja dezinfekcije i vrsti korištenih dezinficijensa
3. podatke o ishrani.

Pitanja vezana uz zdravstveni status na razni uzgajivačnice uključivala su:

1. podatke o reproduktivnom statusu
2. provođenje cijepljenja, dehelmintizacija, zabilježene pojave bolesti s naglaskom na kliničke znakove oboljenja dišnog sustava.

Podaci o reproduktivnom statusu na razini uzgajivačnice uključuju pojavu reproduktivnih poremećaja (izostanka koncepcije, resorpcije plodova, pobačaja, mrtvorođene štenadi i uginuća štenadi do tri tjedna starosti). Također, bilježilo se pare li mužjaci samo unutar uzgajivačnice ili pare i izvan nje.

4.2.2. Epizootiološki upitnik - podaci na razini jedinke

Prema dobi, psi su bili podjeljeni u dvije skupine: skupinu pasa mlađih od dvije godine i psi od dvije godine i stariji. Ova podjela je uzeta iz razloga što uzgojne kuje do dobi od dvije godine završe s odlascima na izložbe i započinju s reprodukcijom. S druge strane, psi kojima je namjena lov, u starosti od 1,5 godine pristupaju ispitu urođenih lovnih osobina i računa se da s dvije godine ulaze u lov. Podjeli prema spolu pristupilo se zbog različitog načina držanja jedinki u uzgajivačnici i zbog razlika u samoj fiziologiji i reprodukciji.

Kod kuja prikupljani su anamnestički podaci o:

1. fazi ciklusa
2. broju parenja
3. uspješnosti parenja (broj legala)
4. broju štenadi u leglu (broj žive štenadi i broj štenadi uginule u prva tri tjedna života, mrtvorođene ili pobačene štenadi).

Kod mužjaka prikupljani anamnestički podaci uključivali su:

1. broj skokova
2. uspješnost skoka
3. eventualne probleme s plodnošću.

4.3. Način uzorkovanja i pohrane uzoraka

4.3.1. Serumi

Za potrebe istraživanja korišteni su ostatni uzorci seruma od kuja i mužjaka kojima je uzimana krv za provjeru zdravstvenog statusa, određivanje faze spolnog ciklusa, u svrhu određivanja optimalnog vremena parenja, određivanja hormonskog statusa pred okot te prilikom određivanja zdravstvenog statusa pred carski rez u kuja. Krv za navedene pretrage uzorkovala se iz *v. cephalice cranialis*, u količini od 5 ml, u sterilne epruvete bez

antikoagulansa. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi kroz 1 sat i centrifugiranja pri 3500 okretaja u minuti tijekom 15 minuta dobiveni serum je odijeljen u Eppendorf® epruvete zapremnine 1,5 ml te pohranjen do daljnjih pretraga pri -20 °C.

4.3.2. Obrisci sluznica

U kuja su uzimani obrisci sluznice nosa i rodnice, a u mužjaka obrisci sluznice nosa i prepucija. Obrisci su uzimani sterilnim štapićem s vatom, laganim rotiranjem nekoliko puta po površini sluznice. U slučaju prisutnosti iscjetka iz nosa, rodnice ili prepucija, uzimao se i iscjedak. Nakon uzorkovanja, vrh štapića s vatom umočio se u 1 ml sterilnog fosfatnog pufera. Do analize uzorci obriska bili su pohranjen u Eppendorf® epruvetama zapremnine 1,5 ml pri temperaturi od -70 °C.

Obrisci rodnice kuja namjenjeni određivanju faze spolnog ciklusa uzimani su na isti način, laganim rotiranjem sterilnog štapića s vatom nekoliko puta po površini sluznice. Analiza obrisaka rodnice obavljena je na dan uzorkovanja, a do trenutka analize bili su pohranjeni pri temperaturi od 4 °C.

4.3.3. Ostali uzorci

U slučaju uginuća štenadi, pristupilo se razudbi i pohranjivanju organa uginule štenadi u zamrzivaču pri -20 °C do analize. Izdvojeni i pohranjeni organi uključivali su bubrege, jetra, slezenu i pluća. Također, u slučaju mogućnosti sakupljanja posteljice ili vaginalnog iscjetka nakon okota kuje, navedeni uzorci i sadržaji bili su pohranjeni u zamrzivaču pri -20 °C do analize.

4.3.4. Izrada razmaza obriska rodnice

Pribor i oprema potrebni za pripremu razmaza obriska rodnice:

- predmetno stakalce
- 96% metanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hvatska)
- Giemsa otopina – polikromatska otopina eozina, metilenskog modrila i azurnih boja (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- fiziološka otopina

- sterilni vateni štapić (Copan, Brescia, Italija)
- svjetlosni mikroskop (Gima, Gessate, Milano, Italija).

Stanice koje se nalaze na vrhu sterilnog štapića s vatom, laganim rotiranjem nanesene su na sredinu predmetnog stakalca. U cilju vezanja stanica za predmetno stakalce, na stanice su nakapane dvije do tri kapi 96% metanola. Nakon sušenja na zraku, na mjesto gdje se nalaze vezane stanice nakapane su dvije do tri kapi Giemsa otopine. Nakon deset minuta, s fiziološkom otopinom isprano je stakalce, kako bi se uklonio višak boje koja nije obojala stanice. Nakon sušenja stakalca morfologija stanica tumačena je pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x).

Mikroskopski razlikujemo epitelne stanice rodnice po obliku i veličini. Razlikujemo parabazalne, intermedijarne i superficijalne stanice. Parabazalne stanice su male, ovalne ili okrugle s velikom jezgrom i malom količinom citoplazme. Intermedijarne stanice su veće od bazalnih (povećanje je od blagog do dvostruke veličine), ali odnos citoplazme i jezgre je drugačiji, veći dio stanice je ispunjen citoplazmom. Jezgre su manje, a oblik stanica je ovalan do nepravilan. Na kraju, razlikujemo superficijalne stanice. To su velike stanice nepravilnog oblika s malom piknotičnom jezgrom ili bez jezgre.

Nalaz parabazalnih i intermedijarnih stanica ukazuje na rani proestrus, a u razmazu su vidljivi neutrofili i eritrociti. Nalaz superficijalih stanica s jezgrom je obilježje srednjeg proestrusa, kao i nestanak parabazalnih stanica i neutrofila. Nalaz više od 80% superficijalih stanica bez jezgre upućuje na estrus. Neutrofili nisu prisutni, a najčešće ni eritrociti. Početak diestrusa karakterizira nagli pad broja superficijalnih stanica pa vaginalni obrisak u diestrusu sadrži oko 60% parabazalnih i intermedijarnih stanica i neutrofile.

4.4. Metoda određivanja razine progesterona u serumu

Razina progesterona u serumu određivala se u laboratoriju Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu imunoenzimnim testom s fluorescentnom detekcijom (engl. Enzyme Lynked Fluorescent Assay, ELFA) iz ostatnih uzoraka seruma, koristeći komercijalni komplet VIDAS®Progesterone (Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, Francuska), u Mini VIDAS automatskom analizatoru (Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, Francuska).

4.4.1. Osnovni principi metode određivanja razine progesterona (ELFA)

Mini VIDAS je u potpunosti automatizirani imunoanalizator namjenjen provođenju testiranja uzoraka seruma ELFA tehnologijom. Reakcija vezivanja analita i protutijela, kao dio imunoenzimnog testa, odvija se u pipeti (SPR pipeta) nakon automatiziranog povlačenja ispitivanog uzorka iz prve jažice reagens kolone (PRG kolona). Sljedećih osam jažica PRG kolone sadrže konjugat, otopinu za ispiranje, razrjeđivač i supstrat. U zadnjoj jažici, u konačnom koraku, alkalna fosfataza hidrolizira supstrat (4-metil umbeliferil) u fluorescentni proizvod, čija se optička gustoća mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Jačina fluorescencije obrnuto je proporcionalna s koncentracijom progesterona u uzorku.

Pribor i oprema potrebni za izvođenje testa:

- mikropipeta 20 - 200 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- nastavci za pipetu.

Svaki mini Vidas komplet sadrži materijal potreban za izvođenje specifičnog testa. U sklopu komercijalnog kompleta ″VIDAS® Progesterone″ nalazi se:

- 60 jednostrukih reagens kolona (PRG – progesteron - kolona),
- 60 PRG SPR (Solid Phase Receptable – nosač krute faze) pipeta – obložena monoklonskim protutijelima za koja se veže progesteron iz uzorka
- PRG kalibracijska otopina, 4 ml, liofilizirana
- PRG kontrola, 3 ml, liofilizirana.

Komercijani komplet za određivanje količine progesterona kao i testirani uzorak seruma moraju biti zagrijani na sobnu temperaturu kroz 30 minuta prije izvođenja testa.

U prvu jažicu testne kolone (PRG strip) dodaje se uzorak seruma u količini od 200µl. Testna kolona i pripadajući SPR se zatim stavlja u analizator, a rezultati se automatski očitavaju nakon 40 minuta.

4.4.2. Kalibracija Mini VIDAS aparata za korištenje ″VIDAS® Progesterone″ testa

Princip kalibracije temelji se na određivanju matematičke ujednačenosti koja predstavlja kalibracijsku krivulju, tj. odnos između referentnih vrijednosti i koncentracije standarda. Ovo određivanje izvodi se s točno definiranom referentnom otopinom (standard). Kalibracijska krivulja ustanovljava se s najmanje pet standarda. Prihvatljive vrijednosti su između nule i standarda s najvišim titrom.

Kalibracija se provodi tijekom proizvodnje svakog novog serijskog broja SPR pipeta i reagensa. Svaki serijski broj povezan je s određenim matematičkim modelom. Za određivanje bazne krivulje standardi se testiraju u sedam različitih serija na istom instrumentu. Srednja vrijednost krivulja tih sedam serija postaje bazna krivulja.

Kalibracija se radila svaki put kada se otvarao novi komplet ″VIDAS® Progesterone″ testa, a rekalibracija svakih 14 dana. Kalibracijom se određuju moguća odstupanja u analizi uzorka zbog skladištenja kompleta. Kalibracija se unosi u Mini VIDAS aparat preko prugastog koda koji se nalazi na kutiji od svakog pojedinog reagens kompleta. Na ovaj način se bazna krivulja pohranjuje u memoriji aparata.

Priprema tekućine za kalibraciju (C1) i kontrolu (S1) Mini VIDAS aparata za korištenje ″VIDAS® Progesterone″ testa je sljedeći:

Pribor i oprema potrebni za kalibraciju:

- mikropipeta 20 - 200 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pipeta 1000 – 5000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- nastavci za pipetu
- destilirana voda
- PRG kalibracijska otopina, liofilizirana (dio komercijalnog kompleta)
- PRG kontrolna otopina, liofilizirana (dio komercijalnog kompleta)
- vrtložnik (Bio Vortex V1, Kisker Bioscience, Njemačka)
- mikroepruvete (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Prije upotrebe, PRG kalibracijsku otopinu bilo je potrebno otopiti u 4 ml destilirane vode. Nakon otapanja, PRG kontrola stabilna je dva tjedna na 2-8 °C ili do isteka roka na -20 °C.

U bočicu koja sadrži PRG kontrolnu otopinu u liofiliziranom obliku dodano je 3 ml destilirane vode. Nakon otapanja, PRG kontrola stabilna je dva tjedna na 2-8 °C ili do isteka roka na -20 °C.

Za potrebu provođenja postupka kalibracije, prije kalibracije reagensi (PRG kalibracijska otopina i PRG kontrola) su zagrijani na sobnu temperaturu. Pojedinačna PRG kolona i PRG SPR korištena je za kontrolnu i kalibracijsku otopinu. Kalibracijska otopina se unosi u tri kolone (S1, S1 i S1), a kontrola u jednu kolonu (C1). Kalibracijska otopina i kontrola promješani su u vrtložniku i uneseni u prvu jažicu pojedine kolone u količini od 200 µl. PRG kolone i PRG SPR stavljene su u aparat i pokrenut je njegov rad. Rezultat kalibracije gotov je kroz 40 minuta.

Komplet ″VIDAS® Progesterone″ testa mora biti pohranjen na temperaturi od +4 °C. Uzorci seruma mogu biti korišteni svježi ili smrznuti ispod -20 °C prije uporabe. Ako se koriste unutar 48 sati od uzorkovanja, moraju biti pohranjeni na +4 °C.

4.5. Serološke metode

Za dijagnostiku CaHV-1 u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zrarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od seroloških metoda korišen je imunoenzimni test (ELISA) i virus neutralizacijski test (VNT).

4.5.1. Imunoenzimni test (ELISA)

U ovom istraživanju namjena imunoenzimnog testa (ELISA) bila je kvalitativno određivanje prisutnosti IgG protutijela za CaHV-1 u ispitivanim serumima. Korišten je komercijalni komplet „Canine Herpes Virus Antibody ELISA“ (B. V. European Veterinary Laboratory, Woerden, Nizozemska).

Princip testa je vezanje virusnih proteina CaHV-1 (vezani na mikrotitracijskoj plitici s 96 jažica) s protutijelima u pretraživanom serumu. Razrijeđeni uzorak psećeg seruma ili plazme dodaje se u jažice mikrotitracijske plitice. Nakon inkubacije i ispiranja, za vezana protutijela, ako su bila prisutna u pretraživanom serumu, vezat će se sekundarna protutijela označena peroksidazom iz hrena. Nakon dodavanja supstrata u jažice doći će do promjene

boje, a intenzitet ovisi o koncentraciji CaHV protutijela u serumu ili plazmi pretraživanog uzorka, te se mjeri određivanjem optičke gustoće (engl. *optical density*, OD) pri valnoj duljini od 450 nm u spektrofotometru.

Kod izvođenja ELISA testa, između svakog koraka inkubacije sve nevezane komponente moraju biti učinkovito uklonjene. Navedeno se postiže odgovarajućim ispiranjem koje se mora provesti na način da omogući dobivanje ponovljivog rezultata. Ispiranje može biti učinjeno ručno ili korištenjem automatskog ispirača mikrotitracijskih plitica. Upotreba automatskog ispiranja je preporučljiva zbog dobivanja boljih rezultata. Prilikom ispiranja potrebno je kontrolirati da li su sve jažice u potpunosti ispražnjene i da li je tekućina za ispiranje pravilno raspoređena te da li doseže rub svake jažice tijekom svakog ciklusa ispiranja. Ispirač mikrotitracijskih plitica mora biti programiran za provođenje određenog broja ciklusa ispiranja, ovisno o uputi proizvođača.

U sklopu komercijalnog kompleta „Canine Herpes Virus Antibody ELISA“ (B. V. European Veterinary Laboratory, Woerden, Nizozemska) nalazi se:

- 12 x 8 mikrotitracijska plitica s adsorbiranim antigenom
- držač mikrotitracijske ploče
- ELISA pufer, 18 ml
- sekundarna protutijela označena peroksidazom, 12 ml
- pozitivna kontrola
- negativna kontrola
- otopina za ispiranje, 20 ml, 200x koncentrirana
- supstrat A, 8 ml,
- supstrat B, 8 ml,
- otopina za zaustavljanje reakcije, 8 ml,
- plastični poklopac.

Pribor i oprema potebni za izvođenje testa:

- mikropipeta 2-20 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- multikanalna mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- nastavci za pipetu
- plastične kadice za pipetiranje
- jednokratne plastične pipete zapremine 5 ml i 10 ml
- staklena menzura
- Erlenmayer tikvice zapremine 50 i 1000 ml
- mikrotitracijska plitica s 96 jažica s ravnim dnom
- dvostruko destilirana sterilna voda (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD)
- štoperica
- ispirač mikrotitracijskih plitica HydroFLEX (TECAN, Männedorf, Švicarska)
- čitač mikrotitracijskih plitica Sunrise (TECAN, Männedorf, Švicarska).

Komplet je bio pohranjen pri temperaturi od +4 °C. Korišteni uzorci prije uporabe bili su pohranjeni pri -20 °C. Pozitivne i negativne kontrole nakon otapanja bile su korištene isti dan, kako bi se izbjeglo ponavljano smrzavanje i odmrzavanje jer se na taj način povećava nespecifičnost reakcije.

Prije izvođenja metode, reagensi su bili izvađeni iz kompleta i držani ± 15 minuta na sobnoj temperaturi (± 21 °C) bez izlaganja direktnom sunčevom svijetlu ili izvoru topline. Pufer, kontrole, standardi i konjugati bili su lagano protreseni prije upotrebe u svrhu rastapanja bilo koje komponente kod koje bi moglo doći do grušanja. S pažnjom su stresene bočice kako bi tekućina koja je ostala u poklopcu bila spuštena nazad u otopinu. Kada je bilo potrebno promiješati tekućine u testnoj jažici, to je bilo učinjeno sa plastičnim nastavkom pipete koji je i bio korišten za navedenu jažicu. Svi reagensi nakon korištenja bili su pohranjeni na 4-8 °C.

Prilikom izvođenja metode, otopina za ispiranje bila je razrijeđena 200x u dvostruko destiliranoj sterilnoj vodi (5 mega Ohm) vodi. Nakon otvaranja dijagnostičkog kompleta, jažice mikrotitracijske plitice bile su pet puta isprane otopinom za ispiranje koristeći automatski uređaj.

Pozitivna kontrola bila je otopljena neposredno pred korištenje s 0,5 ml dvostruko destilirane sterilne vode, a negativna kontrola s 1 ml dvostruko destilirane sterilne vode.

U ELISA puferu, u eppendorf epruvetama zapremine, napravljena su razrjeđenja pozitivne i negativne kontrole u omjeru 1:30 i ispitivanih seruma u omjeru 1:100.

Dvije jažice bile su određene kao kontrola supstrata i u njih je dodano samo 140 µl ELISA pufera.

Nakon navedenog, 100 µl svih razrjeđenja nakapano je u mikrotitracijsku pliticu s apsorbiranim antigenom. Mikrotitracijska plitica je zatvorena ljepljenjem prozirne folije i inkubirana pri 37 °C u trajanju od 60 minuta.

Nakon inkubacije mikrotitracijska plitica je isprana otopinom za ispiranje pet puta prema protokolu. Nakon ispiranja, u svaku jažicu je razdijeljeno po 100 µl sekundarnih protutijela označenih peroksidazom. Mikrotitracijska plitica je prekrivena prozirnom folijom i inkubirana pri 37 °C u trajanju od 60 minuta.

Slijedilo je ispiranje mikrotiracijske plitice pet puta prema protokolu. Nakon ispiranja, jednaki dijelovi pufera A i B su pomješani neposredno prije uporabe, te je razdijeljeno 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu. Mikrotitracijska plitica bila je inkubirana pri sobnoj temperaturi (21°C) u trajanju od 10 do 15 minuta u mraku. Nakon inkubacije dodano je 50 µl stop otopine u svaku jažicu kako bi zaustavili reakciju.

Vrijednost apsorbancije je očitana unutar 10 minuta pri valnoj duljini od λ=450 nm, koristeći spektrofotometar.

U svrhu validacije rezultata testa, srednja vrijednost (SV) izmjerene optičke gustoće pozitivne kontrole mora biti OD $\geq$ 0.850. SV izmjerene optičke gustoće negativne kontrole mora biti OD $\leq$ 0.350.

Prije tumačenja rezultata, potrebno je izračunati SV izmjerene optičke gustoće negativne (NC) i pozitivne kontrole (PC). Odnos (S/P) optičke gustoće uzorka i srednje vrijednosti optičke gustoće pozitivne kontrole računat je po formuli:

$$S/P = (OD_{uzorak} - SV\ OD_{NC})/(SV\ OD_{PC} - SV\ OD_{NC})$$

Kod kvalitativnog očitavanja rezultata, oni uzorci kod kojih je S/P odnos < 0,23 smatraju se negativni. Uzorci sa S/P odnosom ≥ 0,23 smatraju se pozitivnima, odnosno sadrže protutijela za CaHV-1.

4.5.2. Virus neutralizacijski test (VNT)

Za potrebe istraživanja koristila se metoda VNT modifikacijom dva ranije opisana postupka izvođenja, s i bez komplementa zamorčića (READING i FIELD, 1999., RONSSE i sur., 2002.).

Pribor i oprema:

- mikropipeta 2-20 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- multikanalna mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- nastavci za pipetu
- jednokratne sterilne pipete 2, 5, 10 i 25 ml
- epruvete zapermine 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- epruvete zapremine 15 i 50 ml (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD)
- plastične bočice za rad sa staničnim kulturama 25, 75 i 150 cm^2
- autoklav (AV500X700) (INKOlab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- sterilne kriotubice
- biozaštitna komora (Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija)
- invertni mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan)
- tresilica za mikrotitracijske plitice (Rotamax 120) (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- vrtložnik (ViBromix 104) (Domel d.o.o., Železniki, Slovenija)
- vodena kupelj (TS-100 Thermo Shaker, Biosan, Latvija)
- Bürker-Türkovu komorica
- hladnjak 4 ˚C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzivač -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzivač -80 °C (Hera freeze HFU B) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD).

Reagensi potrebni za proizvodnju antigena:

- minimalni esencijalni medij (MEM) s Hanksovim solima (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- L-glutamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- fetalni teleći serum (FTS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

- otopina antibiotika za rad sa staničnim kulturama (penicilin 1000 i.j./ml, streptomicin 500 µg /ml, amfotericin B 2 µg /ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- solna otopina za ispiranje (balansirana otopina Hanksovih soli bez Ca2+ i Mg2+ i fenolnog crvenila) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- 0,05% otopina tripsina EDTA pH 7,0 (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD)
- dimetil-sulfoksid (DMSO) (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD).

4.5.2.1. Umnažanje stanica linijske stanične kulture MDCK

Umnažanje (pasaža) linijske stanične kulture psećih epitelnih stanica tubula bubrega MDCK izvodilo se u posebno proizvedenim bočicama za stanične kulture s čepom s rupicama i filtrom. Veličina bočica ovisi o potrebnoj količini stanica i može biti površine 25 cm^2, 75 cm^2 ili 150 cm^2.

Pasaža stanica učinjena je u trenutku kada stanice u potpunosti pokriju površinu bočice u jednom sloju u omjeru 1:2. U MEM, otopinu tripsin-EDTA i solnu otopinu za ispiranje prije korištenja u radu sa stanicama je na svakih 100 mlilitara odgovarajuće otopine dodan 1 ml otopine antibiotika. Također, sve ove otopine prije uporabe morale su biti zagrijane na temperaturu od 37 ˚C. Ovo se izvodilo stavljanjem bočica s odgovarajućim otopinama i hranjivim medijem u vodenu kupelj zagrijanu pri 37 ˚C.

Iz bočice s umnoženim stanicama odliven je hranjivi medij u potpunosti i u bocu automatskom pipetom ili izravnim preljevanjem dodana je solna otopina u količini dostatnoj da pokrije stanice u jednoličnom sloju od 5 mm nakon što se bočica polegne. Na ovaj način ispirani su ostatci hranjivog medija i omogućena je bolja učinkovitost enzimatske aktivnosti tripsina. Vrijeme potrebno za ispiranje određeno je po izgledu sloja stanica. Ispiranje je bilo završeno kada se jasno mogao uočiti sloj stanica kao jednolično bijelo zamućenje površine bočice na kojoj se stanice umnožavaju uz kontrolu mikroskopiranjem. Koristeći pipetu uklonjena je solna otopina iz bočice.

Nakon ispiranja u bočicu površine 25 cm^2 dodan je 1 ml otopine tripsin-EDTA, u bočice površine 75 cm^2 2 ml i bočice površine 150 cm^2 3 ml. Tripsinizacija je bila završena kada se sloj stanica gotovo u cijelosti odvojio od stijenke bočice. Da bi se ovo olakšalo povremeno je bilo potrebno protresti bočicu.

Kada je ustanovljeno da su se stanice odvojile od stjenke boce, dodano je nekoliko mililitara unaprijed pripremljenog hranjivog medija. Pipetom je u nekoliko navrata

promiješan sadržaj koji je zatim podijeljen u više bočica. Stanice su se uzgajale u termostatu s 5% CO_2 pri 37° C.

4.5.2.2. Umnažanje CaHV-1 na staničnoj kulturi

Za infekciju stanica bilo je potrebno prirediti barem dvije bočice površine 25 cm^2 kulture MDCK s konfluentnošću oko 80%. Nakon odstranjivanja hranjivog medija sa stanica, u jednu je bočicu dodan 1 ml MEM-a, a u preostale 1 ml otopljene suspenzije virusa, soj ATCC VR-552. Nakon inkubacije u termostatu s CO_2 pri 37 °C tijekom sat vremena, dodano je 9 ml hranjivog medija zagrijanog na 37 °C i 200 µl FTS. Bočica sa stanicama kojima je u prvom koraku dodan samo MEM služila je kao negativna kontrola.

Bočice su svakodnevno provjeravane na pojavu citopatogenog učinka (CPU) kroz četiri do sedam dana. Nakon što bi CPU zahvatio 60% i više stanica inkubacija se prekidala i cijela bočica bi se dvokratno zamrzavala pri -20°C i odmrzavala pri sobnoj temperaturi. Dobivena suspenzija CaHV-1 se centrifugirala pri 1500 okretaja/min kroz 15 min. Dobiveni supernatant se razdijelio u kriotubice u volumenu od 1 ml i pohranio pri -80°C do daljnjeg korištenja.

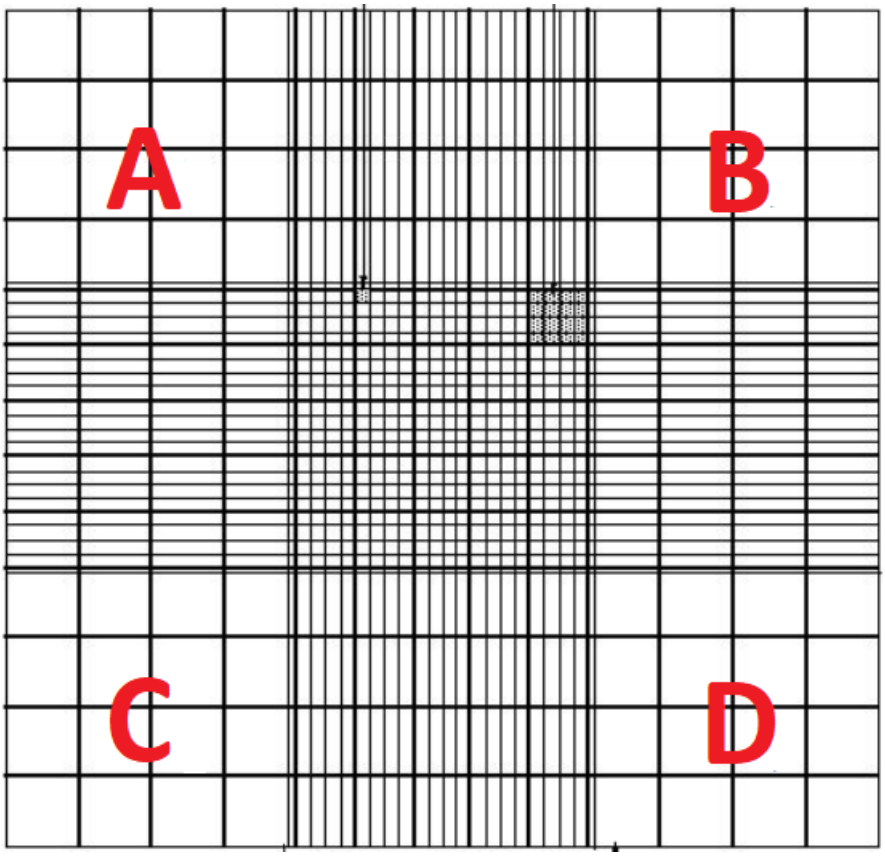
4.5.2.3. Priprema stanica linijske stanične kulture MDCK za izvođenje VNT

Na ranije opisan način pripremljene su otopine hranjivog medija, solne otopine i otopine tripsin-EDTA.

Bocu sa stanicama tripsiniziralo se na ranije opisan način. U Ependorff epruvetu zapremine 1.5 ml dodalo se 100 µl 0.4%-tne otopina tripanskog modrila i isti volumen suspenzije stanica.

Sadržaj epruvete mješalo se uvlačeći i ispuštajući sadržaj pipetom nekoliko puta i promješan sadržaj ostavio se 3-5 minuta pri sobnoj temperaturi.

Nekoliko kapi sadržaja iz epruvete preneseno je na Bürker-Türkovu komoricu i brojane su neobojene (žive) stanice. Stanice su brojane u četiri kvadrata (A, B, C i D) kako je označeno na slici 4.



Slika 4. Brojenje neobojenih (živih) stanica na Bürker-Türkovoj komorici

Broj stanica u mililitru suspenzije tripsiniranih stanica izračunalo se prema formuli:

$$A = N:4 * 2 * 10^4$$

U ovoj formuli A je bio broj stanica u jednom mililitru suspenzije, a N je bio izbrojani broj živih stanica u sva četiri kvadrata. Dodavanjem odgovarujećeg volumena hranjivog medija stanice su se razrijedile do potrebne koncentracije.

4.5.2.4. Određivanja optimalnog broja MDCK stanica za izvođenje VNT

Za potrebe izvođenja VNT bilo je potrebno odrediti optimalnu koncentraciju MDCK stanica. Broj stanica mora biti dovoljno veliki da dozvoli umnažanje CaHV-1, a da pri tome stanice ne pokriju dno jažice prerano i da ne počne njihovo odumiranje jer se CPU CaHV-1 pojavljuje između trećeg i sedmog dana.

Potrebno je bilo pripremiti dvije mikrotitracijske plitice s 96 jažica. Nakon što je u MEM dodana antibiotska otopina u 5 ml ovog medija dodano je 10% komplementa zamorčića, a u drugih 5 ml 10% FTS. U svaku jažicu jedne plitice dodano je 50 µl MEM s FTS, a u jažice druge plitice isti volumen MEM s 10% komplementa zamorčića.

U po dvije kolone plitica dodano je 50 µl suspenzije stanica koncentracije 1, 3, 5, 7 i $9x10^4$ stanica/ml. U zadnja dva reda plitice dodano je 50 µl $1x10^5$ stanica/ml. Ovako pripremljene plitice inkubirane su pri 37 ºC kroz sedam dana pri čemu su se jažice svakodnevno provjeravale na stupanj konfluentnosti staničnog sloja i prisutnost mrtvih stanica u supernatantu.

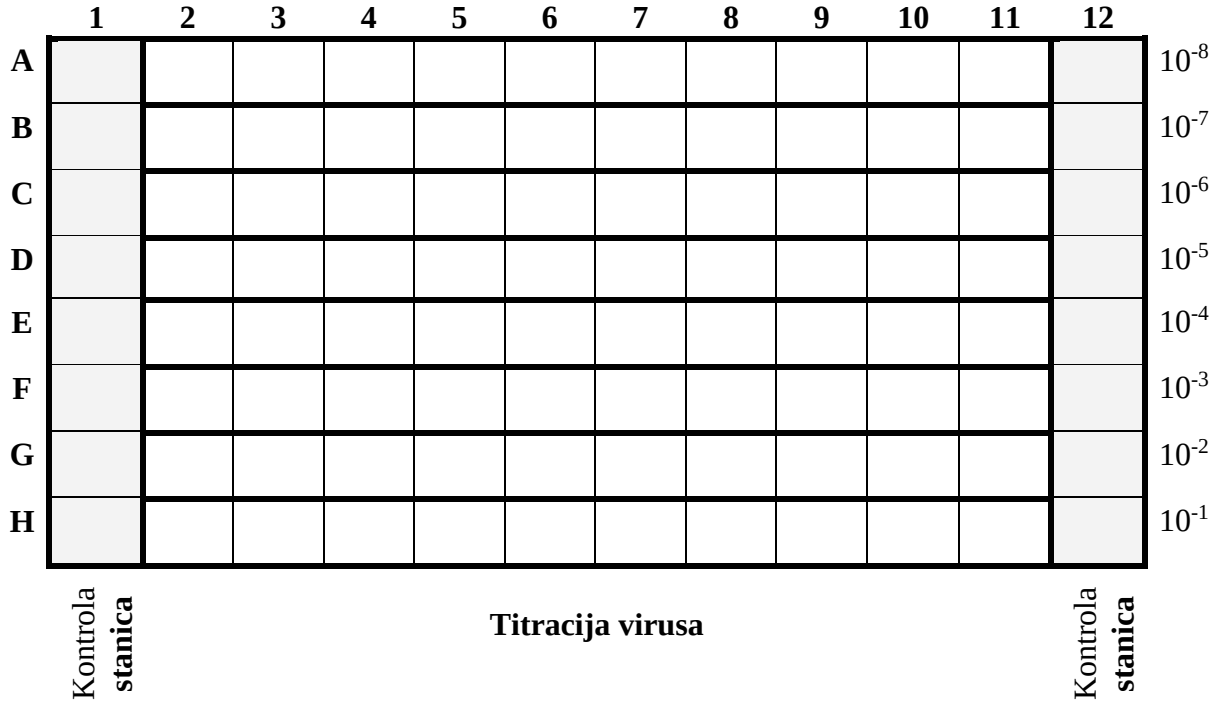
4.5.2.5. Određivanje titra CaHV-1 virusa

Kriotubicu s umnoženim CaHV-1 izvadilo se iz zamrzivača -80 °C. U osam Falcon epruveta zapremine 10 ml dodalo se po 450 µl MEM-a s 10% FTS, a u narednih osam isti volumen MEM-a s 10% seruma zamorčića. Nakon što se virus otopio u prvu bočicu dodalo se 50 µl umnoženog virusa CaHV-1. Izmješao se sadržaj bočice pipetom na način da se najmanje pet puta izvukao i ponovno iz pipete vratio sadržaj u bočicu. Nakon toga iz prve bočice 50 µl mješavine prebacilo se u drugu bočicu i tako dalje u svih osam bočica koje sadrže hranjivi medij s FTS. Isti postupak se ponovio i u svih osam bočica koje sadrže hranjivi medij sa serumom zamorčića s oznakom 10^{-2}. Na ovaj način priređena su desetorostruka uzastopna razrijeđenja virusa koja se koriste u titraciji.

U sve jažice dvije mikrotitracijske plitice dodalo se po 25 µl MEM-a, osim u jažice prve i dvanaeste kolone obje plitice u koje se dodalo po 50 µl MEM-a.

Prethodno razrijeđen virus dodao se u jažice mikrotitracijske plitice u količini od 25 µl na način da se razrijeđeni virus iz prve bočice (razrijeđenje 10^{-1}) dodalo u jažice 2-11 reda H, virus iz druge bočice (razrijeđenje 10^{-2}) u jažice 2-11 reda G, te dalje po istom principu do jažica 2-11 reda A u koje se dodalo istu količinu razrijeđenja virusa iz osme bočice (razrijeđenje virusa 10^{-8}) (Slika 5.).

Ovako pripremljene plitice inkubiralo se tijekom 1 h u termostatu s 5% CO_2 pri 37 °C nakon čega se u sve jažice plitice dodalo po 50 µl suspenzije prethodno pripremljenih stanica. Plitice pripremljene na opisani način inkubiralo se u termostatu s 5% CO_2 pri 37 °C do očitavanja rezultata.



Slika 5. Shema plitice za izvođenje titracije virusa

4.5.2.6. Interpretacija rezultata

Rezultate titracije CaHV-1 virusa očitavalo se nakon 48, 72 i 96 sati. Prvo se pregledavala kontrola stanica. Jažice koje su sadržavale kontrolu stanica morale su sadržavati jednolični, u potpunosti konfluentan, zdrav sloj stanica MDCK. Ako je kontrola stanica pokazivala bilo kakvu naznaku toksičnih promjena stanica ili promjena koje nalikuju CPU titracija je smatrana nevaljanom i postupak se morao ponoviti.

Jažice u koje je dodan virus u različitim razrijeđenjima i koje prilikom očitavanja rezultata sadrže udio stanica zahvaćenih CPU-om iznad 50% označavale su se kao pozitivne zasjenjivanjem na radnom obrascu. One jažice kod kojih je CPU zahvaćao manje ili 50% sloja stanica označavale su se kao negativne na radnim obrascima.

Rezultat titra virusa na osnovu kojeg se radi razrjeđenje virusa u SVD izračunavao se iz očitanih rezultata prema Reed-Muench-ovoj formuli.

Reed-Muenchova formula je formula prema kojoj se izračunavao titar virusa na osnovu očitanih rezultata izostanka ili nazočnosti CPU u jažicama mikrotitracijske plitice prilikom titracije virusa.

Brojčano se izrazio broj jažica s izraženim CPU (stupac 2. tablice 1), odnosno bez CPU (stupac 3. tablice 1) po pojedinom razrijeđenju.

U stupac 4. tablice 1 upisao se kumulativni broj jažica s izraženim CPU počevši od reda A s najvećim razrijeđenjem virusa (10^{-8}) prema redu H s najmanjim razrijeđenjem (10^{-1}).

U stupac 5 tablice 1 upisao se kumulativni broj jažica bez izraženog CPU počevši od reda H s najmanjim razrijeđenjem virusa (10^{-1}) prema redu A s najvećim razrijeđenjem (10^{-8}).

U šestom stupcu tablice 1 upisao se zbroj kumulativnih vrijednosti iz stupaca 4 i 5 za svako razrijeđenje.

U posljednjem 7. stupcu tablice 1 upisao se izračunati postotak jažica s CPU po pojedinom razrijeđenju virusa (redu) tako da se kumulativni zbroj jažica s izraženim CPU-om podijelio sa zbrojem kumulativnih brojeva jažica sa i bez CPU za isti red (stupac 6 tablice 1). Nakon toga proporcionalnu udaljenost izračunalo se prema formuli:

$$\frac{(\%\text{ jažica s CPU iznad 50\%}) - 50\%}{(\%\text{ jažica s CPU iznad 50\%}) - (\text{postotak jažica s CPU ispod 50 \%})}$$

Vrijednost proporcionalne udaljenosti oduzimao se od negativnog logaritma prvog razrijeđenja u kojem je postotak jažica s izraženim CPU bio iznad 50%. Dobiveni rezultat je bio negativan logaritam polovične infekcijske doze ($TCID_{50}$, engl. tissue culture infective dose) u količini virusa korištenoj u titraciji CaHV-1.

Dobiveni rezultat antilogaritmiralo se i dobio se titar virusa u volumenu od 25 µl izražen u $TCID_{50}$.

Tablica 1. Izračunavanje optimalnog razrijeđenja virusa za pripremanje standardne virusne doze (SVD)

Razrijeđenje virusa	Broj jažica s izraženim CPU	Broj jažica bez CPU	Kumulativne vrijednosti			Postotak jažica s CPU
			Jažice s izraženim CPU (A) (od 10^{-8} prema 10^{-1})	Jažice bez izraženog CPU (B) (od 10^{-1} prema 10^{-8})	Ukupno (A+B)	A/(A+B) x 100 (%)
10^{-1}	10 ↑	0 ↓	29	0	29	100%
10^{-2}	10 ↑	0 ↓	19	0	19	100%
10^{-3} *	6 ↑	4 ↓	9	4	13	69%
10^{-4}	3 ↑	7 ↓	3	11	14	21%
10^{-5}	0 ↑	10 ↓	0	21	21	0%
10^{-6}	0 ↑	10 ↓	0	31	31	0%
10^{-7}	0 ↑	10 ↓	0	41	41	0%
10^{-8}	0 ↑	10 ↓	0	51	51	0%

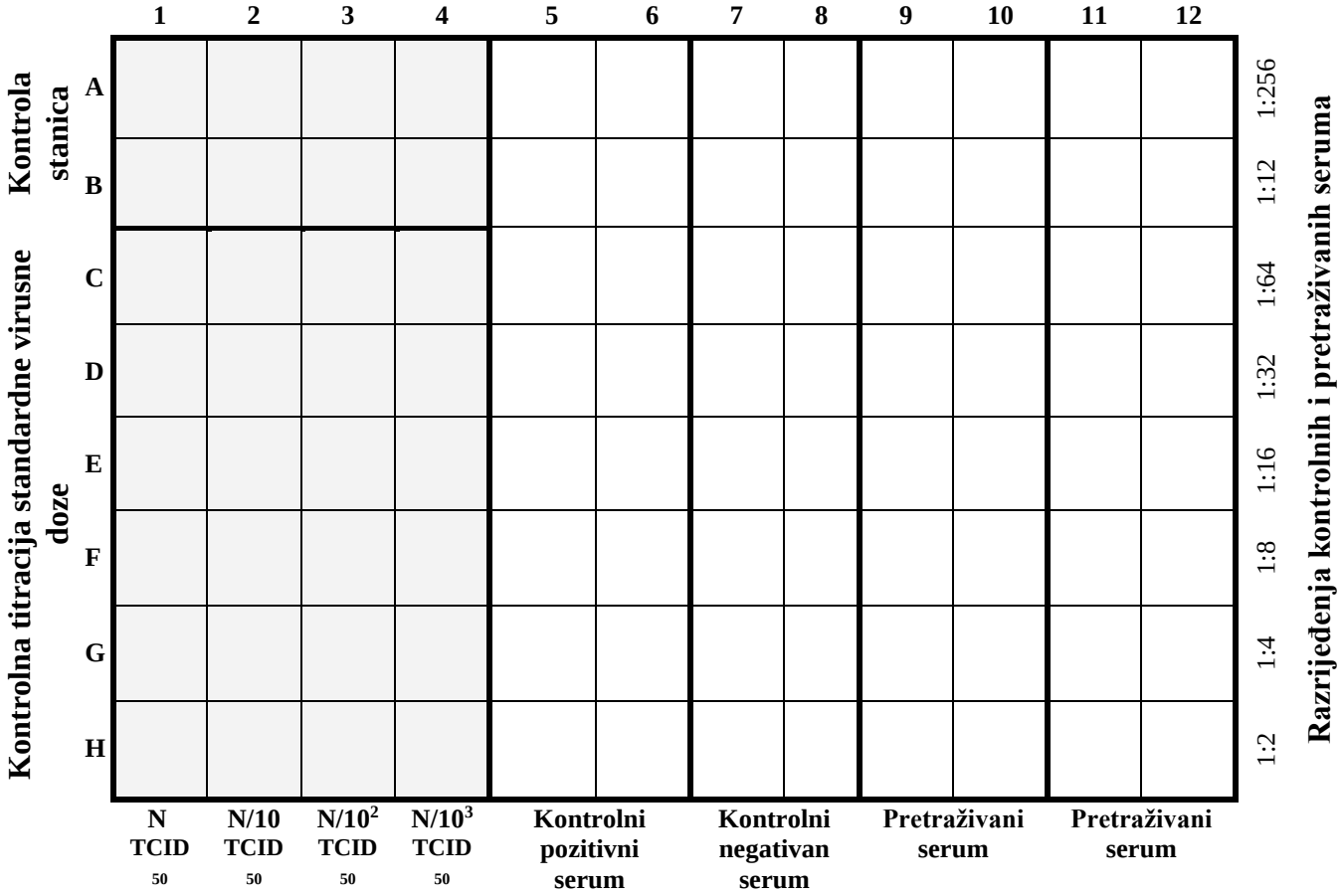
Obzirom da je zapremina CaHV-1 virusa korištenoga u titraciji bila jednaka zapremini virusa koji se koristi kao SVD u izvođenju VNT, omjer u kojem je bilo potrebno razrijediti titrirani virus dobio se tako da se izračunati titar pomnožio sa 100, 300 i 500. Dobiveni broj je bilo potrebno razrijeđenje virusa kako bi se priredila radna otopina CaHV-1 virusa koji u 25 µl sadržava 100, 300 odnosno 500 $TCID_{50}$.

4.5.2.7. Izvođenje VNT

Za pripremu seruma, za potrebe ovog istraživanja, načinjene su tri inačice protokola pretrage ispitujućih seruma ovisno o izvoru komplementa. U prvom slučaju korišteni su nativni, toplinski neobrađeni uzorci ispitujućih seruma. U drugom postupku ispitujući serumi su toplinski obrađeni s ciljem inaktivacije komplementa, a u nastavku postupka korišten je serum zamorčića kao izvor komplementa koji je dodan u volumnom omjeru od 10% u radnu otopinu CaHV-1. U trećem slučaju korišteni su toplinski inaktivirani uzorci ispitujućih seruma bez dodataka seruma zamorčića.

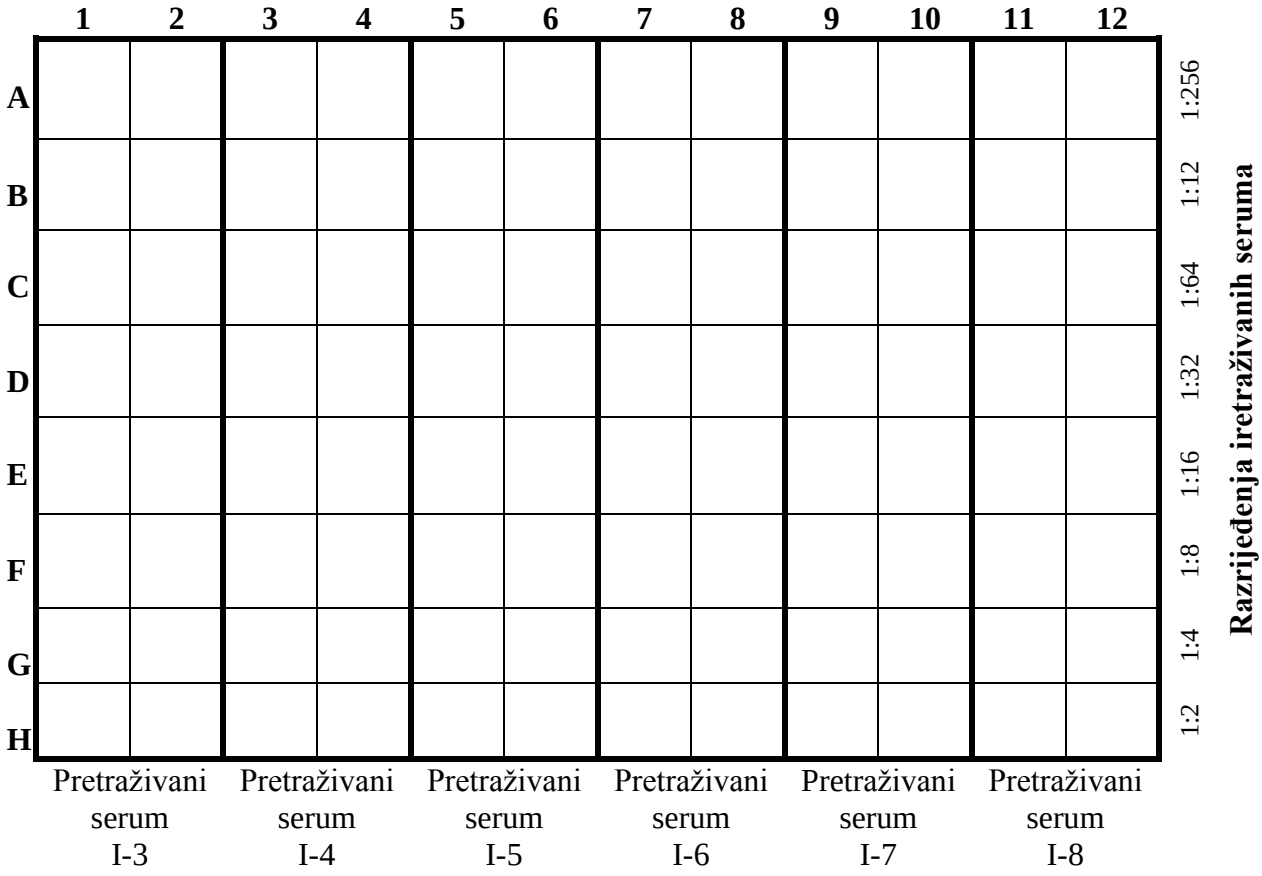
Za toplinsku inaktivaciju ispitujućih seruma uzimalo se najmanje 100 µl seruma, koristeći sterilne nastavke za pipetu, u Eppendorf epruvete obilježene vodootpornim markerom oznakom sukladnom oznaci zaprimljenog uzorka. Serume se inaktiviralo u vodenoj kupelji tijekom 30 minuta pri 56 ˚C.

Za pripremu razrijeđenja kontrolnih seruma, ovisno o broju pretraživanih seruma, uzimalo se tri ili više mikrotitracijskih plitica s ravnim dnom, te ih se okrenulo vodoravno i vodootpornim markerom na poklopcu označilo na način kako je prikazano na slikama 6 i 7.



N – titar standardne virusne doze

Slika 6. Shema kontrolne (prve) plitice za izvođenje VNT



Slika 7. Shema plitice za izvođenje VNT

U svaku jažicu mikrotitracijskih plitica dodalo se po 25 µl MEM-a u koje je dodana antibiotska otopina. Na kontrolnoj plitici u jažice A1 do A4 i B1 do B4, koje služe kao kontrola stanica pri izvođenju svakog VNT, stavljalo se 50 µl medija.

Na kontrolnoj plitici u jažice H5 i H6 stavljalo se 25 µl kontrolnog pozitivnog seruma. Na istoj plitici u jažice H7 i H8 stavljalo se 25 µl kontrolnog negativnog seruma tako da je u navedenim jažicama razrijeđenje kontrolnih seruma bilo 1:2. U ostale jažice u redu H kontrolne plitice, kao i u preostale plitice dodavali su se ispitujući serumi u duplikatu.

Sadržaj jažica reda H koji sadrže kontrolne ili testirane serume miješao se na način da se najmanje pet puta sadržaj jažice povukao pipetom i zatim ispustio u istu jažicu. Nakon toga se pipetom prebacilo 25 µl izmješanog sadržaja u odgovarajuće jažice u istom stupcu, reda G. Nakon mješanja sadržaja jažica reda G, na prije opisani način, ponovo se 25 µl prebacilo u jažice reda F i tako se nastavljao postupak prebacivanja i mješanja sve do jažica reda A iz kojih se nakon mješanja odbacilo 25 µl sadržaja. Na ovaj način načinjena su dvostruka razrijeđenja kontrolnih i ispitujućih seruma od 1:2 do 1:256.

Određena optimalna standardna virusna doza dobivena je na način da se virus nakon odmrzavanja razrijedio hranjivim medijem uz dodatak 10% FTS ukoliko se radilo o nativnim uzorcima seruma. Za toplinski inaktivirane testne serume korišten je ili hranjivi medij s 10% FTS ili 10% seruma zamorčića. Pri svakom izvođenju VNT kontroliran je titar SVD na način da su bila načinjena desetorostruka uzastopna razrijeđenja SVD. Ovako razrijeđen CaHV-1, u volumenu od 25 µl, dodana je u šest prvih jažica kontrolne plitice reda 1-4.

U sve preostale jažice plitica, osim kontrole stanica, stavljeno je po 25 µl standardne virusne doze.

Plitice su zatim inkubirane jedan sat u termostatu s 5% CO_2 pri 37 °C nakon čega se u sve jažice svih plitica dodaje po 50 µl suspenzije prethodno pripremljenih stanica MDCK. Plitice pripremljene na opisani način inkubiraju se u termostatu s 5% CO_2 pri 37 °C do očitavanja rezultata.

U svrhu interpretacije rezultata, rezultati pretrage VNT očitavani su nakon 72 i 96 sata. Prvo se pregledavala kontrola stanica. Jažice koje sadrže kontrolu stanica morale su sadržavati jedan zdrav sloj stanica, u svakom drugom slučaju pretraga je bila ponovljena u cijelosti.

Titracija standardne doze virusa morala je izazvati CPU u svim kolonama osim u koloni gdje je razrijeđena 1000 puta, u suprotnom postupak je bio proglašen nevaljanim i morao je biti ponovljen.

Jažice u kojima udio stanica zahvaćenih CPU-om prelazi 50% cijelog sloja stanica označavaju se kao pozitivne. Jažice u kojima nije izražen CPU ili ne prelazi 50% cijelog sloja stanica označavaju se kao negativne.

Za očitavanje i izračunavanje rezultata pretraga, vrijednost titra specifičnih protutijela izračunavala se kao geometrijska sredina očitanih rezultata prema sljedećoj formuli izračunavanja geometrijske sredine:

$$\text{titar} = \sqrt[2]{a * b}$$

gdje su vrijednosti a i b odgovarajuće vrijednosti posljednjeg razrijeđenja seruma na plitici u kojem se ne pojavljuje CPU.

Primjer: izračunavanje titra – CPU posljednji put izostaje pri razrijeđenjima 1:16 i 1:8

$$\sqrt[2]{16 * 8} = 11{,}3 \longrightarrow \text{Titar pretraživanog seruma} = 1{:}1$$

4.6. Molekularne metode

4.6.1. Izdvajanje DNK

4.6.1.1. Izvođenje postupka izdvajanja DNK iz uzoraka briseva sluznice nosa, rodnice i prepucija

Za izdvajanje korišten je komercijalni komplet NucleoSpin® Tissue, (GmbH & Co. KG, Duren, Njemačka). S komercijalni kompletom NucleoSpin® Tissue moguće je izdvajanje DNK iz tkiva, stanica ili iz različitih drugih izvora (bakterija, kvasaca, forenzičkih uzoraka, seruma, plazme i drugih tjelesnih tekućina). Dobivena pročišćena DNK se može koristiti izravno za PCR ili za bilo koju vrstu enzimatske reakcije. Razgradnja pretraživanog uzorka se potiže uz prisutnost proteinaze K, koja dovodi do proteolize u uzorku. Odgovarajući uvijeti za vezivanje DNK za silikonsku membranu kolone postižu se dodatkom kaotropne soli i etanola. Proces vezanja je povratan i specifičan za nukleinske kiseline. Kontaminacije se uklanjaju ispiranjem sa dva različita pufera. DNK se u zadnjem koraku ispire u uvjetima niske ionske snage u blago lužnatom puferu za ispiranje. Korišten je protokol za pročišćavanje genomske DNK iz obrisaka bukalne sluznice.

Pribor i oprema:

- mikropipeta 10-100 μl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 100-1000 μl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- sterilni nastavci za mikropipetu
- sterilne Eppendorf epruvete zapremnine 2 ml
- mikrocentrifuga (Biofuge fresco) (Heraeus, Frankfurt, Njemačka)
- vodena kupelj (TS-100 Thermo Shaker, Biosan, Latvija)
- vrtložnik (ViBromix 104) (Domel d.o.o., Železniki, Slovenija)
- ledenica -80 °C (Hera freeze) (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
- silikonske kolone (u sastavu komercijalnog kompleta NucleoSpin® Tissue)
- epruvete za sakupljanje tekućina (u sastavu komercijalnog kompleta NucleoSpin® Tissue).

Reagensi:

- etanol 96%
- PBS (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD).

Reagensi koje sadrži komercijalni komplet za izdvajanje virusne DNK (NucleoSpin® Tissue):

- Pufer BE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5)
- Pufer BW (Guanidin hidroklorid 36-50%, 2-propanol 20-50%, CAS 50-01-1, 67-63-0)
- Pufer B3 (Guanidin hidroklorid 36-50%, CAS 50-01-1)
- Pufer PB
- Pufer B5 (koncentriran)
- Proteinaza K (liofilizirani oblik).

Proteinaza K nalazi se u liofiliziranom obliku te je za pripremu radne otopine bilo potrebno dodati 3.35 ml pufera PB. Nakon razmućivanja bočicu je bilo potrebno držati u zamrzivaču pri –20 °C.

Također, za pripremu Pufera B5 u bočicu je bilo potrebno dodati 50 ml etanola radi aktivacije.

Izvođenje postupka izdvajanja DNK iz uzoraka briseva sluznice nosa, rodnice i prepucija bilo je slijedeće. U prvom koraku je 400 µl uzorka premješteno u sterilne Eppendorf® epruvete zapremnine 2 ml te je dodano 25 µl proteinaze K. Nakon dvostrukog centrifugiranja u trajanju od pet sekundi na vrtložniku, dobivena smjesa je inkubirana pri 56 °C u trajanju od deset minuta u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, u smjesu je dodan pufer B3 u količini od 400 µl. Smjesa je centrifugirana u trajanju od pet sekundi na vrtložniku i inkubirana pri temperaturi od 70 °C u trajanju od deset minunta u vodenoj kupelji. Smjesi je dodano 400 µl etanola, nakon čega je slijedilo centrifugiranje na vrtložniku u trajanju od pet sekundi.

Nakon navedenog je slijedilo prebacivanje 600 µl smjese iz Eppendorf® epruveta u označenu kolonu uloženu u epruvetu za prikupljanje tekućine. Slijedilo je centrifugiranje u mikrocentrifugi pri 11 000 x g kroz jednu minutu. Tekućina koja je prošla kroz kolone bila je odbačena. Kolone su ponovno bile uložene u epruvete za prikupljanje tekućine, te je u njih ukapano preostalih 600 µl smjese iz Eppendorf® epruveta te je ponovljen postupak centrifugiranja pri 11000 x g kroz jednu minutu.

Kod prvog ispiranja dodano je 500 µl pufera BW u kolonu, slijedilo je centrifugiranje u trajanju od jedne minute pri 11 000 x g. Tekućina koja je prošla kroz kolone bila je odbačena, a kolone vraćena u epruvete za prikupljanje tekućine.

Kod drugog ispiranja dodano je 600 µl pufera B5, slijedilo je centrifugiranje u trajanju od jedne minute pri 11 000 x g. Tekućina koja je prošla kroz kolone bila je odbačena, a kolone vraćene u epruvete za prikupljanje tekućine. Nakon navedenog, centrifugirane su kolone u trajanju od jedne minute na 11 000 x g. Tijekom ovog koraka se uklanjao ostatni etanol.

U zadnjem koraku kolone su stavljene u Eppendorf® epruvete te je dodano 100 µl pufera BE. Smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi jednu minutu te je centrifugirana u trajanju od jedne minute pri 11 000 x g. U Eppendorf® epruveti je dobivena tekućina s ekstrahiranom DNK koja je pohranjena u ledenici pri -20 °C do korištenja.

4.6.1.2. Izvođenje postupka izdvajanja DNK iz organa štenadi i tkiva posteljice

Za izdvajanje korišten je komercijalni komplet NucleoSpin® (GmbH & Co. KG Duren, Njemačka).

Za izdvajanje DNK iz organa štenadi i tkiva posteljice korišten je protokol za ljudska i životinjska tkiva i stanične kulture.

Pribor i oprema:

- mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- sterilni nastavci za mikropipetu
- sterilne Eppendorf epruvete zapremnine 2 ml
- mikrocentrifuga (Biofuge fresco) (Heraeus, Frankfurt, Njemačka)
- vodena kupelj (TS-100 Thermo Shaker, Biosan, Latvija)
- vrtložnik (ViBromix 104) (Domel d.o.o., Železniki, Slovenija)
- zamrzivač -80 °C (Hera freeze) (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
- silikonske kolumne (u sastavu komercijalnog kompleta NucleoSpin® Tissue)
- epruvete za sakupljanje tekućina (u sastavu komercijalnog kompleta NucleoSpin® Tissue).

Reagensi:

- etanol 96%
- PBS (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD).

Reagensi koje sadrži komercijalni komplet za izolaciju virusne DNK (NucleoSpin® Tissue):

- Pufer BE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5)
- Pufer BW (Guanidin hidroklorid 36-50%, 2-propanol 20-50%)
- Pufer B3 (Guanidin hidroklorid 36-50%)
- Pufer PB
- Pufer B5 (koncentriran)
- Pufer T1
- Proteinaza K (liofilizirani oblik).

Priprema radne otopine Proteinaze K zahtjeva dodavanje 3.35 ml pufera PB jer se prije upotrebe Proteinaza K nalazi u liofiliziranom obliku. Nakon razmućivanja bočicu je potrebno držati u zamrzivaču pri –20 °C.

Prilikom pripreme Pufera B5 u bočicu je bilo potrebno dodati 50 ml etanola radi aktivcije.

Za pripremu uzorka, izrezano je 25 mg tkiva u male komadiće te je uzorak stavljen u sterilne Eppendorf epruvete zapremnine 2 ml. Dodano je 180 µl pufera T1 i 25 µl otopine Proteinaze K. Smjesa je centrifugirana u trajanju od jedne minute i inkubirana pri 56 °C dok nije došlo do potpune razgradnje tkiva (minimalno 1-3 sata) u vodenoj kupelji. Nakon toga, uzorci su centrifugirani i dodano je 200 µl Pufera B3, ponovno je centrifugirano i inkubirano pri 70 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon navedenog, smjesa je ponovno kratko promješana i dodano je 210 µl etanola (96-100%) u uzorak zbog prilagodbe uvijeta vezanja DNK. Smjesa je ponovno promješana koristeći vrtložnik. Za svaki uzorak, stavljena je silikonska kolona u epruvetu za sakupljanje tekućina. Uzorci su premješteni u silikonsku kolonu i centrifugirani pri 11 000 x g u trajanju od jedne munute. Odbačena je epruveta za sakupljanje tekućina te je silikonska kolona smještena u novu epruvetu za sakupljanje tekućina. Ispiranje je bilo započeto dodavanjem 500 µl pufera BW u silikonsku kolonu nakon čega je slijedilo centrifugiranje pri 11 000 x g u trajanju od jedne minute. Tekućina koja je prošla kroz silikonsku kolonu je bila odbačena, a kolona se vraćala u epruvetu za sakupljanje tekućina.

Nakon toga slijedilo je drugo ispiranje dodavanjem 600 µL pufera B5 u silikonsku kolonu nakon čega je slijedilo centrifugiranje pri 11 000 x g u trajanju od jedne munute. Odbacila se tekućina koja je prošla kroz silikonsku kolonu, a kolona se vraća u epruvetu za sakupljanje tekućina. Silikonska kolona se centrifugira pri 11,000 x g u trajanju od jedne minute zbog uklanjanja ostatnog etanola. Silikonska kolona se smještala u sterilne Eppendorf epruvete i dodalo se 100 µl pufera BE. Smjesa na sobnoj temperaturi inkubira se u trajanju od jedne minute i centrifugira na 11 000 x g u trajanju od jedne minute. Dobivena je tekućina s ekstrahiranom DNK te pohranjena u zamrzivaču pri -20 °C do korištenja u PCR metodi.

4.6.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

4.6.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR metoda) u kojoj se umnaža dio gena za timidin kinazu

Korištenu metodu opisali su DECARO i sur. (2010.). Navedena metoda je modifikacija metode opisane po SCHULZE i BAUMGÄRTNER (1998.). PCR metodom umnaža se dio gena za timidin kinazu psećeg herpesvirusa.

Pribor i oprema:

- mikropipeta 1 - 10 µl, (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 10 - 100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mikropipeta 100 - 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- nastavci za pipetu
- Eppendorf epruvete volumena 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- epruvetice za PCR zapremine 0,2 ml
- PCR uređaj (BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cycler, BioRad, Richmond, SAD)
- sustav za provođenje elektroforeze (Scie - Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- izvor električne struje (CS-300V) (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- kadica za provođenje elektroforeze (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- kalupi za agarozni gel s pripadajućim češljevima za jažice

- parafinski film
- saklena tikvica zapremnine 100 ml
- mikrovalna pećnica (MO6240SY2W , Gorenje, Velenje, Slovenija)
- sustav za detekciju DNA pod ultraljubičastim svjetlom (Gel Doc 200, BioRad, Richmond, SAD)
- mikrocentrifuga (Biofuge fresco) (Heraeus, Frankfurt, Njemačka)
- tresilica (Rotamax 120) (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- magnetska mješalica (RTC basic) (IKA, Staufen, Njemačka)
- pH-metar (WTW pH330/SET-1) (WTW, Wilheim, Njemačka).

Reagensi:

- agaroza u prahu (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Tris baza (Tris (hidroksimetil) aminometan) (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- ledena octena kiselina (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- boja za DNK u agaroznom gelu (GelStar, Lonza Rockland, SAD)
- biljeg veličine DNK odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNK veličine po 100 pb (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo (Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD).

Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom bio je sljedeći.

Reagensi:

- otopina uzvodnih i nizvodnih početnica
- voda bez nukleaza (voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD))
- otopina deoksiribonukleotida (dNTP, TaKaRa), 10 mM
- reagensi u sastavu komercijalnog kompleta za izvođenje PCR reakcije, Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD):

- pufer za izvođenje PCR reakcije bez magnezija, 10x koncentriran (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- enzim Platinum Taq polimeraza, 5 U/µl
- otopina magnezijevog klorida, $MgCl_2$, 50 mM.

Početnice korištene u izvođenju molekularne metode (Metabion International AG, Planegg, Njemačka):

- CHV1 TCG CGC TTT TAT ATA GAT G
- CHV2 AAG CGT THT AAA AGT TCG T

Reakcijska smjesa za PCR:

Potrebni reagensi za jedan uzorak (dobiva se ukupno 9 µl reakcijske smjese kojoj se dodaje 1 µl ispitivanog uzorka):

- 5,975 µl vode bez nukleaza
- 1 µl pufera za PCR reakciju (10x)
- 0,3 µl $MgCl_2$ (50 mM)
- 0,8 µl dNTP smjese (10 mM)
- 0,4 µl otopine uzvodne početnice (10 µM)
- 0,4 µl otopine nizvodne početnice (10 µM)
- 0,125 µl Platinum Taq polimeraze (5 U/µl).

Komercijalni pripravci korišteni su za dobivanje završne koncentracije reagensa: voda bez nukleaza 5,75 µL, 10X pufer 1 µL, $MgCl_2$ 0,3 µL, dNTP Mix 0,8 µL, CHV1 i CHV2 početnice po 0,4 µL i Taq polimeraza 0,125 µL. U ukupno 9 µL dobivenog pripravka dodan je 1 µL uzorka, odnosno 1 µL pozitivne i negativne kontrole. Kao pozitina kontrola, korišten je CHV-1 soj ATCC VR-552. Kao negativna kontrola, korištena je voda bez nukleaza. Virusna DNK umnažana je početnim korakom denaturacije (početna aktivacija enzima polimeraze) pri 94 °C u trajanju od tri minute, praćeno s 43 ciklusa denaturacije DNK lanca pri 94 °C u trajanju od jedne minute, vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza pri 53 °C i produljenje početnica pri 72 °C u trajanju od jedne minute. Završno produljenje umnoženih sljedova DNK pri 72 °C u trajanju od 10 minuta.

4.6.2.2. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom prema metodi ugniježđene PCR

Panherpes PCR (VANDEVANTER i sur., 1996.) je metoda ugniježđene PCR kojom se umnaža dio gena za herpesvirusnu DNK polimerazu od oko 800 parova baza. Za izvođenje PCR reakcije korišten je PCR uređaj BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cycler, BioRad, Richmond, SAD.

Reagensi:

- otopina vanjskih uzvodnih i nizvodnih početnica
- voda bez nukleaza (voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD))
- otopina deoksiribonukleotida (dNTP, TaKaRa), 10 mM.

Reagensi u sastavu komercijalnog kompleta za izvođenje PCR reakcije, Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD):

- pufer sa uravnoteženim koncentracijama soli potrebnim za izvođenje PCR reakcije, 10x koncentriran
- otopina magnezijevog klorida, $MgCl_2$, 50 mM
- otopina deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 mM
- enzim Platinum Taq polimeraze, 5 U/µl.

Početnice korištene u izvođenju molekularne metode (Metabion International AG, Planegg, Njemačka):

- HV-DFA 5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3'
- HV-ILK 5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3'
- HV-KG1 5'-GTC TTG CTG ACC AGN TCN ACN CCY TT -3'
- HV-TGV 5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT -3'
- HV-IYG 5'-CAC AGA GTC CGT RTC NCC RTA DAT -3'.

Reakcijska smjesa za PCR:

Potrebni reagensi za jedan uzorak (dobiva se ukupno 8 µl reakcijske smjese kojoj se dodaje 2 µl pretraživanog uzorka):

- 4,3 µl vode bez nukleaza

- 1 µl pufera za PCR reakciju (10x)
- 0,3 µl $MgCl_2$ (50 mM)
- 0,8 µl dNTP smjese (10 mM)
- 0,5 µl otopine uzvodne početnice HV-DFA (10µM)
- 0,5 µl otopine uzvodne početnice HV –ILK (10µM)
- 0,5 µl otopine nizzvodne početnice HV –KG1 (10µM)
- 0,125 µl Platinum Taq polimeraze (5 U/µl).

Komercijalni pripravci korišteni su za dobivanje završne koncentracije reagensa: voda bez nukleaza 4,3 µL, 10X pufer 1 µL, $MgCl_2$ 0.3 µL, dNTP Mix 0.8 µL, HV-DFA, HV-ILK i HV-KG1 početnice po 0.5 µL i Taq polimeraza 0.125 µL. U ukupno 8 µL dobivenog pripravka dodan je 2 µL uzorka, odnosno 2 µL pozitivne i negativne kontrole. Kao pozitina kontrola, korišen je CaHV-1 soj ATCC VR-522. Kao negativna kontrola, korištena je voda bez nukleaza. Virusna DNK umnažana je početnim korakom denaturacije (početna aktivacija enzima polimeraze) pri 95 °C u trajanju od pet minuta, praćeno s 50 ciklusa denaturacije DNK lanca pri 95 °C u trajanju od 30 sekundi, vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza pri 46 °C i produljenje početnica pri 72 °C u trajanju od 1 minute. Završno produljenje umnoženih sljedova DNK pri 72 °C u trajanju od deset minuta.

Potrebni reagensi za jedan uzorak (dobiva se ukupno 4 µl reakcijske smjese kojoj se dodaje 1 µl PCR produkta):

- 2,4 µl vode bez nukleaza
- 0,5 µl pufera za PCR reakciju (10x)
- 0,15 µl $MgCl_2$ (50 mM)
- 0,4 µl dNTP smjese (10 mM)
- 0,25 µl otopine uzvodne početnice HV-TGV (10µM)
- 0,25 µl otopine nizvodne početnice HV –IYG (10µM)
- 0,063 µl Platinum Taq polimeraze (5 U/µl).

Virusna DNK umnažana je početnim korakom denaturacije (početna aktivacija enzima polimeraze) pri 95 °C u trajanju od pet minuta, praćeno s 45 ciklusa denaturacije DNK lanca pri 95 °C u trajanju od 30 sekundi, vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza pri

46 °C i produljenje početnica pri 72 °C u trajanju od jedne minute. Završno, konačno produljenje umnoženih sljedova DNK pri 72 °C u trajanju od 7 minuta.

4.6.3. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu

Reagensi:

- agaroza u prahu Tris baza (Tris (hidroksimetil) aminometane)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)
- ledena octena kiselina
- boja za DNA u agaroznom gelu
- biljeg veličine DNA odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNA veličine po 100 pb
- otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo

Priprema radnih otopina:

50X koncentrirana otopina TAE:

Reagensi:

- Tris baza 242 g
- ledena octena kiselina 57,1 g
- EDTA (0,5 M) 100 ml
- destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerene su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici. Vrijednost pH otopine bio je 8,5.

0,5 M otopina EDTA:

Reagensi:

- EDTA 186,1 g
- destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerene su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici. Vrijednost pH otopine bio je 8,0.

Agarozni gel:

Reagensi:

- agaroza u prahu 0,7 g
- TAE pufer 75 ml
- boja za DNK 0,25 µl

Gel je napravljen otapanjem 0,7 g agaroze u prahu u 75 ml TAE, 1X pufera. Otopina agaroze se zagrijala do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja agaroze i kratkotrajnog hlađenja gela dodala se boja za DNK u tekuću agarozu. Da bi se u gelu dobile jažice u još tekuću agarozu se stavio plastični češalj za formiranje jažica. Nakon polimerizacije agaroze, uklonio se češalj za formiranje jažica i gel se stavio u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi TAE pufer.

Postupak izvođenja elektroforeze u agaroznom gelu bio je slijedeći. Na parafilmu se pomiješalo 3 µl svakog proizvoda PCR metode s 3 µl otopine brom fenol plavila. Mješavinu svakog uzorka mikropipetom se prenjelo u jažice gela. U jednu jažicu dodalo se biljeg veličine DNK odsječaka. Elektroforeza se provodila u uređaju za elektroforezu, pri naponu 100 V, jakosti struje 80 mA, u trajanju 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze prisutnost PCR proizvoda u gelu provjerila se pod UV svjetlom u komori za snimanje gelova, te se gel fotografirao pomoću kamere s filtrima za UV svjetlost koja je bila spojena s računalnim programom koji omogućuje pohranu fotografije, u svrhu dokumentiranja uspješnosti PCR reakcije.

4.7. Praćenje kasne faze gravidnosti i okota kuja

Kasna faza gravidnosti i okota praćena je u maksimalnom broju kuja koje su bile dostupne za istraživanje. Kuje su bile podrijetlom iz iste uzgajivačnice, iste su pasmine, s postojećim reproduktivnim problemima. Za istraživanje je odabrana uzgajivačnica pasa veće pasmine zbog mogućeg većeg broja štenadi u leglu. Navedeno je prednost zbog mogućeg većeg broja fetometrijskih mjerenja na istoj kuji tijekom jednog ultrazvučnog pregleda. Također, nakon okota, u jednom leglu je veći broj štenadi koja ulaze u statističku analizu.

Praćena je visina rektalne temperature kroz četiri dnevna mjerenja (u sedam, u 12, u 17 i u 21 sat). Određivana je prosječna i najniža rektalna temperatura i broj sati od najniže rektalne temperature do okota. Kuje su imale isti dnevni ritam izlaska u ispust i hranjenja, kako bi izmjerene vrijednosti rektalne temperature bile što ujednačenije.

Razina progesterona određivana je pet dana prije očekivanog termina okota s ciljem što točnijeg predviđanja početka okota i mogućih komplikacija. Krv je uzorkovana u isto vrijeme (u podne, prilikom drugog mjerenja rektalne temperature) zbog smanjenja utjecaja dnevnih fluktuacija u vrijednostima serumskog progesterona. Vrijednosti za statističku obradu uzimani su samo u zadnjih 48 sati, 24 sata i na dan okota.

Za procjenu broja dana do okota, fetometrijska mjerenja kod minimalno dva ploda po mjerenju, rađena su uz pomoć ultrazvučnog uređaja Mindray DP-2200 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, Kina), koristeći mikrokonveksnu sondu jačine 5-8 MHz.

U više kuja mjeren je i unutarnji promjer korionske šupljine (ICC), uzimajući kod mjerenja srednju vrijednost dva transverzalna promjera. Dobivene mjere uvrštene su u formulu za kuje srednjih pasmina: predviđeni dani do okota (dd) su razlika izmjerenog promjera unutarnjeg promjera korionske šupljine i faktora 82,13 podijeljeno sa 1,8 (dd = (mm – 82,13)/1,8).

U kuja mjeren je razmak između dvije tjemene kosti (BPD) ploda u trenutku kada je vidljiv u podužnom položaju a udaljenost je određena u trenutku kada su tjemene kosti bile paralelne. Dobivene mjere uvrštene su u dvije formule. Korištena je Luvoni–Grioni formula za srednje teške pse (10-25 kg): predviđeni dani do okota (dd) su razlika promjera između dvije tjemene kosti ploda i faktora 29,18, koja se dijeli s 0,7 (dd = (mm - 29,18)/0,7). Također je korištena formula korekcije za velike pasmine po SOCHA i JANOWSKI (2011.): predviđeni dani do okota (dd) su razlika promjera između dvije čeone kosti ploda i faktora 31,19, koja se dijeli s 0,8 (dd = (mm -31,19)/0,8).

Praćene kuje su rendgenološki snimljene u postranom položaju 55. dan od prvog dana parenja, u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Snimke su rađene u cilju utvrđivanja približnog broja plodova te provjere prisutnosti uginulih plodova.

4.8. Statistička obrada rezultata

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programima Statistica v.13 (TIBCO Software Inc., 2017) i MedCalc Statistical Software v.19 (MedCalc Software bvba, 2019). Statistička značajnost je određivana na razini $p<0,05$.

Prilikom obrade podataka, a nakon provjere normalnosti raspodjele Kolomogorov-Smirnovim testom, ovisno o broju i veličini skupina, korištene su metode t-testa, Mann–Whitney U testa, jednosmjerne analize varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallis analize varijance (ANOVA) koje je zatim slijedio *post hoc* Tukey HSD test za nejednaki broj (N) uzoraka.

Prikupljeni podaci za broj pasa razvrstan po čimbenicima rizika prikazani su u tablicama u obliku cijelih brojeva i postotaka. Prilikom izračuna utjecaja čimbenika rizika u tablicama 2x2 korišten je test omjera izgleda (OR, engl. *odds ratio*) ili hi-kvadrat test (χ^2 test).

Prikupljeni podaci za visinu titra prikazani su kao geometrijska sredina (G) i geometrijska standardna devijacija (GSD). Za statističku obradu visine titra, kao i normalizaciju raspodjele, korištene su njihove recipročne logaritmirane vrijednosti.

Za svaki od čimbenika rizika je prvo provedena zasebna analiza povezanosti sa seropozitivnošću na CaHV-1 kao i s visinom titra CaHV-1 protutijela. U sljedećem koraku, kao dodatnoj analizi, napravljeni su modeli. Kako bi izgradili najbolji odgovarajući model, korištena je stupnjevita regresijska analiza (logistička regresija u slučaju analize utjecaja čimbenika na seroprevalenciju) *stepwise* metodom.

Za utvrđivanje povezanosti između varijabli korištena je korelacija. Nakon provjere normalnosti raspodjele Kolomogorov-Smirnovim testom, kod obrade kvantitativnih varijabli, za podatke koji nisu pratili normalnu raspojelu korištena je Spearmanova korelacija (r_s). Ukoliko se promatrala povezanost između kvalitativnih nominalnih varijabli korišten je Cramerov V koeficijent (V).

Za usporedbu ELISA i VNT korišteni su osjetljivost, specifičnost i Cohen's kappa parametar (κ) (WATSON i PETRIE, 2010.).

Osjetljivost je svojstvo dijagnostičke pretrage da jedinke s određenom bolešću razvrsta kao pozitivne i računana je po slijedećoj formuli:

Osjetljivost: [broj stvarno pozitivnih uzoraka/(broj stvarno pozitivnih uzoraka + broj lažno negativnih uzoraka)]*100

Specifičnost je svojstvo dijagnostičke pretrage da razvrsta jedinke bez oboljenja kao negativne i računana je po slijedećoj formuli:

Specifičnost : [broj stvarno negativnih uzoraka/(broj stvarno negativnih uzoraka + broj lažno pozitivnih uzoraka)]*100.

Kod izračuna kapa parametra (%poklapanja) koristila se formula = [(broj ELISA pozitivnih seruma i broj VNT pozitivnih seruma) + (ELISA negativnih seruma i VNT negativnih seruma)]/ukupan broj seruma.

Kapa statistika varira u rasponu od 0-1, gdje su vrijednosti:

0 = potpuno ne poklapanje vrijednosti testova

0.1 – 0.20 = blago poklapanje

0.21 – 0.40 = dobro poklapanje

0.41 – 0.60 = umjereno poklapanje

0.61 – 0.80 = jako poklapanje

0.81 – 0.99 = skoro potpuno poklapanje

1 = potpuno poklapanje vrijednosti testova

5. REZULTATI

5.1. Populacija pasa

5.1.1. Prikupljeni podaci na razini uzgajivačnice

Istraživanjem je sveukupno bilo obuhvaćeno 26 uzgajivačnica s ukupno 203 psa.

Predmetni psi su se mogli razvrstati u 16 pasmina: labrador retriever (119 pasa), njemački (17 pasa), belgijski (osam pasa), kavkaski (četiri psa) i nizozemski ovčar (jedan pas), argentinska doga (sedam pasa), vajmarski (deset pasa) i njemački (sedam pasa) ptičar, Akita (deset pasa) i Shiba Inu (sedam pasa), mops (pet pasa), oštrodlaki jazavčar (tri psa), epanijel breton (dva psa) te još pojedinačno: njemački bokser, engleski seter i patuljasti pinč.

Prema namjeni, bilo je 18 uzgajivačnica izložbenih pasa, četiri uzgajivačnice pasa namjenjenih za lov te dvije uzgajivačnice službenih pasa. Psi iz dvije uzgajivačnice bili su korišteni samo za rasplod, bez sudjelovanja na izložbama ili u lovu.

Ukupno je bilo 14 velikih i 12 malih uzgajivačnica.

Svi psi u uzgajivačnicama držani su u građenom objektu s vanjskim betonskim ispustom, s mogućnošću izlaska na travu. Svi psi su bili unutar uzgajivačnice u izravnom kontaktu jedni s drugima, pogotovo prilikom držanja u ispustu. Kada su psi u boksovima, često su držani po dva ili više pasa u jednom boksu. Skotne kuje i kuje sa štenadi držane su odvojeno; štenad je grijana s lampom koja se nalazi iznad kotilice, u kojoj se nalazi deka ili sijeno.

U dvije uzgajivačnice provodi se svakodnevna, tekuća dezinfekcija, u ostalih 24 uzgajivačnice svakodnevno se skuplja izmet, a dezinfekcija se provodi sporadično, kod pojave bolesti ili prije okota kuje. U tri uzgajivačnice provodi se temeljita dezinfekcija jednom godišnje (bojanjem nastambe, posipanje dvorišta s gašenim vapnom). Kao dezinficijens koriste se kvaterni amonijevi spojevi (Ekocid) u deset uzgajivačnica, u osam uzgajivačnica klorni preparati (Domestos, Izosan, Cekina, solna kiselina), u pet uzgajivačnica klorheksidin (Plivasept) te vodena para.

Način ishrane u svim uzgajivačnicama je podjednak, osniva se na sirovom mesu u kombinaciji s komercijalnom hranom za pse srednje kvalitete.

Prema anamnestičkim podacima, od ukupno 26 uzgajivačnice, u pet uzgajivačnica nisu zabilježeni reproduktivni poremećaji.

Podaci o zdravstvenom statusu na razni uzgajivačnice (cijepljenja izuzev protiv CaHV-1, dehelmintizacija, pojava bolesti s naglaskom na kašlja legla i parazitarne invazije) i

načinu vođenja uzgajivačnice (koriste li se mužjaci za parenje kuja iz drugih uzgajivačnica ili mužjaci pare samo kuje iz uzgajivačnice) su bili nepotpuni i nisu uzeti u obzir u istraživanju.

5.1.2. Prikupljeni podaci na razini jedinke

Od 203 psa u istraživanju, 136 bile su kuje i 67 mužjaci. Srednja vrijednost dobi iskazana medijanom u trenutku uzorkovanja bila je tri godine (raspon od četiri mjeseca do 13 godina); srednja vrijednost dobi kuja 3,25 godina (četiri mjeseca – 12 godina) i mužjaka tri godine (četiri mjeseca – 13 godina).

Kod kuja, s obzirom na fazu spolnog ciklusa, u proestrusu pretraženo je 23 kuja, u estrusu 28 kuja, u diestrusu 51 kuja i u anestrusu 82 kuje. S obzirom na broj parenja, od ukupnog broja kuja (136 kuja) 28 kuja nije pareno, 33 kuje parene su samo jednom, a 75 kuja je pareno više puta. Podaci o uspješnosti parenja (broj legala) parenih kuja nisu bili dostupni.

Reproduktivni poremećaji zabilježeni su u 47 kuja. Podaci o broju štenadi u leglu (broj žive štenadi, uginule u prva tri tjedna života, mrtvorođene ili pobačene štenadi) bili su dostupni jedino za 12 kuja kod kojih je praćen kasni stadij gravidnosti i okot.

U skupini mužjaka, od 67 jedinki 30 nikada nije parilo. Od mužjaka koji su parili, zabilježeno je manje od pet parenja kod devet mužjaka, 5-25 parenja 14 mužjaka i više od 25 parenja 14 mužjaka. Podaci o uspješnosti skoka nisu bili dostupni. Problemi s plodnošću zabilježeni su kod tri mužjaka.

5.1.3. Prikupljeni uzorci

U prvoj fazi istraživanja uzorkovano je 203 životinja (136 kuja i 67 mužjaka). U uzgajivačnicama u kojima su ustanovljeni reproduktivni poremećaji načinilo se dodatno uzorkovanje. Dodatno je uzorkovano 59 seruma i 118 briseva kuja (od ukupno 44 kuja koje su uzorkovane u više faza ciklusa) te 15 seruma i 30 obriska mužjaka iz 13 uzgajivačnica (iz sedam uzgajivačnica labrador retrivera, te iz uzgajivačnice vajmaraskih ptičara, njemačkih ptičara, njemačkih ovčara, Akita inu i Shiba inu i argetinskih doga) (tablica 2.)

Tablica 2. Tablični prikaz sakupljenih uzoraka seruma i obriska

Uzorkovanje	serumi			obrisci			
	kuje	mužjaci	ukupno	nos	rodnica	prepucij	ukupno
Prva faza istraživanja	136	67	203	203	136	67	406
Druga faza istraživanja	44	15	59	118	44	15	168
Ukupno			262				574

Od ukupnog broja uzoraka seruma, 92 seruma pretraženo je imunoenzimnim testom (ELISA) i 262 seruma pretraženo je virus neutralizacijskim testom (VNT).

Dodatno u istraživanju, zbog boljeg razumjevanja dinamike titra protutijela, pretraženo je i 40 seruma cijepljenih kuja.

5.1.4. Praćenje skotnosti

U okviru jedne uzgajivačnice s reproduktivnim problemima praćeno je 17 gravidnosti u ukupno 12 kuja. Ostatni uzorci seruma sakupljani su tijekom kasnog graviditeta kao i u drugim fazama ciklusa (ukupno sakupljeno 26 seruma) kako bi se što točnije odredio serološki status kuje. Također, tijekom kasne gravidnosti sakupljani su obrisci nosne sluznice (25 obrisaka) i obrisci rodnice (26 obrisaka) u svrhu praćenja mogućeg izlučivanja CaHV-1 putem sluznica.

Praćenjem 17 skotnosti učinjeno je 340 mjerenja rektalne temeprature.

Iz ukupno 51 uzoraka seruma, sakupljenih dva dana pred okot, jedan dan pred okot i na sam dan okota, razina progesterona određena je iz 48 seruma. Tri uzorka seruma bila su kontaminirana.

U navedenih 17 skotnosti oštenjeno je 119 štenadi (prirodnim putem 11 skotnosti i carskim rezom šest skotnosti). Oštenjeno je 94 žive, vitalne štenadi i 25 malformirane, mrtvooštenjene, avitalne i/ili uginule štenadi u prvih 24 sata nakon okota.

Prilikom praćenja kasne gravidnosti, od ostalih uzoraka prikupljeni su unutarnji organi (bubrezi, jetra, slezena i pluća) od osam uginule štenadi kao i iscjedak iz rodnice prilikom okota tri kuje.

Od ostalih kuja u istraživanju prikupljni su unutarnji organi deset štenadi i dvije posteljice; zajedno s ostalim prikupljenim uzorcima (ukupno 81 uzorak) pohranjeni su u zamrzivač na -20°C do testiranja.

5.2. Rezultati seroloških pretraga

5.2.1. Rezultati imunoenzimnog testa i interperetacija rezultata

Optička gustoća (OD) pozitivne kontrole (mjesto B1) bila je OD = 3,462 i na mjestu B2 OD = 3,445. Za negativnu kontrolu (mjesto A1) izmjerena je OD = 0,419 , a kao druga vrijednost (mjesto A2) izmjerena je OD = 0,376 (tablica 3.). Na mjestina C1 i C2 izmjerena je OD = 0,232 i OD = 0,234 (slijepa proba).

Tablica 3. ELISA ploča – rezultati. Pozitivna kontrola nalazi se na mjestima B1 i B2, negativna kontrola na mjestima A1 i A2 i slijepa proba na mjestina C1 i C2

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**0,419**	**0,376**	1,45	1,035	0,654	0,591	0,56	0,664	1,265	0,626	1,225	0,91
B	**3,462**	**3,445**	0,274	0,689	0,939	0,481	1,771	0,9	0,902	0,588	0,917	1,123
C	**0,232**	**0,234**	0,621	1,255	0,703	0,592	1,095	1,309	0,888	0,515	0,581	0,488
D	1,143	2,261	1,005	1,663	0,55	0,778	0,855	0,931	0,712	0,989	0,834	0,824
E	0,65	0,737	1,524	1,159	0,474	0,769	0,994	0,76	1,463	0,848	1,026	0,64
F	1,101	1,297	0,71	0,821	0,337	0,748	1,693	0,671	2,33	0,549	0,92	0,662
G	0,744	0,93	1,262	1,483	2,047	1,03	0,585	1,408	1,26	0,876	0,761	0,469
H	1,22	0,435	0,699	0,639	2,46	0,718	0,849	1,522	1,45	1,122	0,738	0,201

Rezultati s ploče ocijenjeni su kao važeći. Izmjerena optička gustoća pozitivne kontrole iznosila je OD = 3,462 i OD = 3,445 (SV OD_{PC} = 3,454). Vrijednosti izmjerene optičke gustoće negativne kontrole iznosila je OD = 0,419 i OD = 0,376 (SV OD_{NC} = 0,398). Uz pomoć formule ($S/P = (OD_{uzorak} - SV\ OD_{NC})/(SV\ OD_{PC} - SV\ OD_{NC})$) određeni su pozitivni (uzorci s S/P odnosom $\geq 0,23$) odnosno negativni (uzorci kod kojih je S/P odnos <0,23) uzorci. Ukupno ELISA metodom dobivamo 27 pozitivnih i 63 negativna seruma

(Tablica 3 i 4). Seroprevalencija CaHV-1 u uzgajivačnicama na području RH je 30% određena imunoenzimnim testom.

Tablica 4. Izdvojene vrijednosti izmjerene optičke gustoće (OD) pozitivne i negativne kontrole

Izmjerena optička gustoća (OD)		
Pozitivna kontrola	3,462	3,445
Negativna kontrola	0,419	0,376

5.2.2. Optimizacija VNT

U dostupnoj literaturi postoji više opisanih protokala za izvođenje VNT međutim ne postoji opće prihvaćeni protokol za izvođenje ove metode (READING i FIELD, 1998., RONSSE i sur., 2002., BOTTINELLI i sur., 2016.).

5.2.2.1. Određivanje optimalne gustoće stanica

Serijskim razrijeđivanjem stanica ustanovljeno je da je optimalna koncentracija stanica u radnoj otopini $7x10^4$ stanica/ml ukoliko se za izvođenje VNT koristi 50 µl ovako priređene suspenzije. Stanice u ovoj koncentraciji davale se nakon 72 i 96 h jednolični potpuni sloj MDCK stanica koji je u potpunosti prekrivao dno jažice. Kada su korištene stanice u većoj koncentraciji, nakon 72 h mogao se vidjeti veći broj mrtvih stanica u supernatantu što bi moglo utjecati na prosudbu rezultata pretrage.

Da bi se dodatno ispitao utjecaj koncentracije stanica na rezultate VNT i titracija virusa se načinila koristeći $7x10^4$, $6x10^4$ i $5x10^4$ stanica/ml u radnoj otopini stanica. Nakon 72 sata prisutnost CPU bio je najlakše uočiti na plitici gdje je korišteno $7x10^4$stanica/ml.

5.2.2.2. Određivanje optimalne koncentracije virusa u radnoj otopini

Nakon što je određen titar virusa metodi po Reed-Muench-u u dva navrata je pretraženo pet nativnih uzoraka seruma (tablica 5.), koristeći 50 µl radne otopine CaHV-1 koncentracije 100, 300 i 500 $TCID_{50}$. Kada je bilo korišteno 100 $TCID_{50}$ bilo je vrlo teško ustanoviti jažice u kojima je CPU zahvatio više od 50% stanica te je navedena koncentracija radne otopine virusa odbačena. Radna otopina virusa od 300 $TCID_{50}$ dala je ujednačenije rezultate između dvije neovisne pretrage istih uzoraka te je korištena za daljnje postupke kao optimalna.

Tablica 5. Prikaz određivanja optimalne koncentracije virusa u radnoj otopini

Oznaka uzorka	Koncentracija CaHV-1 ($TCID_{50}$)/50µl					
	100		300		500	
	1. očitanje	2. očitanje	1. očitanje	2. očitanje	1. očitanje	2. očitanje
Fallon	1:8	1:32	1:8	1:8	1:8	1:32
31	0	0	0	0	0	0
39	citotoksično	citotoksično	citotoksično	citotoksično	citotoksično	citotoksično
Lady	>1:256	>1:256	1:128	1:128	1:91	1:128
173-s	>1:256	>1:256	1:128	1:128	1:128	1:64

5.2.2.3. Utjecaj toplinske inaktivacije i dodatka komplementa zamorčića na rezultate ispitivanja

Toplinska inaktivacija uobičajeni je postupak koji se koristi prilikom virus-neutralizacijskog testa da bi se spriječio utjecaj bakterijske kontaminacije uzoraka na rezultate pretrage. Nažalost tijekom navedenog inaktivira se i komplement koji je prisutan u serumu te kako bi se povećala osjetljivost VNT potrebno ga je naknadno dodati i to najčešće dodatkom nativnog seruma zamorčića (CARAMICHAEL, 1970.).

Nasumičnim odabirom pretraženo je 135 uzoraka seruma pasa obuhvaćenih ovim istraživanjem (tablica 6.) i to kao: nativni uzorci, nakon toplinske inaktivacije i nakon toplinske inaktivacije uz dodatak 10% volumena komplementa zamorčića.

Tablica 6. Usporedba titra protutijela dobivenih s tri različite metode (pretragom nativnog seruma, pretragom inaktiviranog seruma i pretragom inaktiviranog seruma s dodatkom komplementa) i rezultata dobivenih ELISA metodom

	Titar			
Oznaka uzorka	Nativni serum	Inaktivirani serum	Inaktivirani serum s dodatkom komplementa	ELISA
206	0	1:8	0	NP
207	0	0	0	NP
208	0	0	0	NP
210	0	1:6	0	NP
230	0	0	0	NP
212	0	0	0	NP
213	0	0	0	NP
214	0	0	0	NP
215	0	0	0	NP
216	0	0	0	NP
217	0	0	0	NP
220	0	0	0	NP
221	0	0	0	NP
223	0	0	0	NP
224	0	0	0	NP
226	0	0	0	NP
228	0	0	0	NP
229	0	0	0	NP
Ili	0	1:8	0	NP
199Magic	1:45	1:2	0	NP
173	1:128	NP	1:4	NP
203	1:11	0	0	NP
204	1:23	0	0	NP
fall	1:8	NP	0	NP
225	1:4	0	0	NP
211	1:4	0	0	NP
219	1:8	1:3	0	NP
201	1:64	1:16	1:8	NP
202	1:16	1:11	1:4	NP
421	1:64	1:16	1:8	NP
426	1:64	64	1:32	NP
433	1:64	128	1:45	NP
326	1:6	1:3	1:6	NP
370	1:8	1:6	1:8	NP
366	1:32	1:16	1:32	NP
373	1:4	1:2	1:2	NP
369	1:8	1:6	1:4	NP

375	1:32	1:8	1:23	NP
344	1:16	1:8	1:8	NP
360	1:4	1:3	1:2	NP
365	1:4	1:3	1:8	NP
330	1:4	1:3	0	NP
333	1:8	1:4	1:4	NP
323	1:8	1:4	1:4	NP
336	1:6	1:4	1:4	NP
NIKOLA	1:32	np	1:11	NP
31	0	0	0	neg
33	0	0	0	neg
36	0	0	0	neg
367	1:2	0	0	neg
12	0	0	0	poz
104	0	0	0	poz
10	0	0	0	poz
99	0	0	0	neg
2	0	0	0	poz
109	0	0	0	neg
124	1:6	1:4	1:3	neg
B44	0	0	0	neg
1	0	0	0	neg
95	0	0	0	poz
113	1:2	0	0	neg
LOV	0	0	0	poz
130	0	0	0	poz
51	0	0	0	neg
110	0	0	0	poz
112	0	0	0	poz
91	0	0	0	poz
84	0	0	0	neg
114	0	0	0	poz
121	0	0	0	neg
126	0	0	0	neg
78	0	0	0	poz
204	1:2	1:6	0	neg
325	1:2	0	0	neg
216	0	0	0	neg
301	0	0	0	neg
211	0	0	0	neg
307	0	0	0	neg
218	0	0	0	neg
306	1:3	0	0	neg
390	0	0	0	neg
225	0	0	0	neg
315	0	0	0	neg

387	0	0	0	neg
386	0	0	0	neg
392	0	0	0	neg
389	0	0	0	neg
429	0	0	0	neg
188	0	0	0	neg
321	0	0	0	neg
415	0	0	0	neg
428	1:16	1:11	1:8	neg
416	0	0	0	neg
409	0	1:2	0	neg
426	1:11	1:16	1:11	neg
413	1:4	1:3	1:2	neg
425	0	0	0	poz
410	0	0	0	neg
414	0	0	0	neg
412	1:8	1:11	1:3	neg
424	1:45	1:8	1:11	neg
423	0	0	0	neg
411	0	0	0	poz
418	1:3	0	0	neg
422	1:2	0	0	neg
419	1:6	1:6	1:4	neg
421	0	0	0	poz
417	0	0	0	poz
420	0	0	0	poz
442	0	0	0	neg
441	0	0	0	poz
440	0	0	0	neg
439	0	0	0	neg
438	0	0	0	neg
436	0	0	0	poz
145	0	0	0	poz
353	0	NP	NP	neg
435	1:11	NP	NP	poz
434	1:32	NP	NP	poz
433	1:64	NP	NP	poz
431	1:32	NP	NP	poz
136	1:64	NP	NP	poz
348	0	NP	NP	neg
432	0	0	0	neg
408	0	0	0	neg
407	0	0	0	neg
406	0	0	0	poz
405	0	0	0	neg
404	0	0	0	neg

403	0	0	0	neg
402	0	0	0	neg
401	0	0	0	neg
400	0	0	0	neg
382	0	0	0	neg
383	0	0	0	poz

Nativni uzorci su u prosjeku imali 3,13 dvostrukih razrijeđenja do konačnog titra protutijela za CaHV-1 u uzorku, za razliku od 2,06 kod toplinski inaktiviranih i 2,73 kod toplinski inaktiviranih uz dodatak komplementa zamorčića te je stoga vidljivo da su titrovi u nativnim uzorcima viši.

U zadnjoj fazi statističke obrade postignutih rezultata načinili smo ispitivanje korelacije dobivenih titrova za ispitivane uzorke u sva tri oblika. Stupanj korelacije rezultata ispitivanja za nativne uzorke i toplinski inaktiviran bio je $r=0,81$ ($p<0,001$), za nativne i toplinski inaktivirane s dodatkom komplementa $r=0,82$ ($p<0,001$) te za inaktivirane i inaktivirane uz dodatak komplementa zamorčića $r=0,88$ ($p<0,001$).

5.2.3. Usporedba rezultata ELISA i VN testa

S obzirom na dobivene rezultate pretraživanja ELISA i VNT metodom, usporedili smo rezultate pretraživanja 89 uzoraka seruma ispitanih s obje metode.

Usporedbom rezultata VNT nativnih uzoraka i ELISA-e, kada se VNT uzima kao zlatni standard, vidljivo je da je sukladnost rezultata testova niska, što dokazuje i cohen kapa niska vrijednost. Povećavanjem graničnog titra VNT za kojega se uzorci proglašavaju pozitivnima, sukladnost rezultata raste do titra 1:8 i dalje ostaje ista ($\kappa = 0,171$). Pri graničnom titru 1:8 specifičnost ELISA-a je maksimalna, a zatim pada (tablice 7. – 12.).

Tablica 7. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma, uz uvjet da je granični titar VNT nula

	Serumi	VNT nativni uzorci seruma, granični titar 0			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	5	22	27	-0,044
	Negativni	14	48	62	
	Ukupno	19	70	89	
	Osjetljivost (%)	26,32			
	Specifičnost (%)	68,57			

Tablica 8. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:2

	Serumi	VNT – nativni uzorci seruma, granični titar 1:2			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	5	22	27	0,046
	Negativni	9	53	62	
	Ukupno	14	75	89	
	Osjetljivost (%)	35,71			
	Specifičnost (%)	70,67			

Tablica 9. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:4

	Serumi	VNT – nativni uzorci seruma, granični titar 1:4			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	5	22	27	0,106
	Negativni	6	56	62	
	Ukupno	11	78	89	
	Osjetljivost (%)	45,45			
	Specifičnost (%)	71,79			

Tablica 10. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:6

	Serumi	VNT – nativni uzorci seruma, granični titar 1:6			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	5	22	27	0,149
	Negativni	4	58	62	
	Ukupno	9	80	89	
	Osjetljivost (%)	55,56			
	Specifičnost (%)	72,50			

Tablica 11. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:8

	Serumi	VNT – nativni uzorci seruma, granični titar 1:8			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	5	22	27	0,171
	Negativni	3	59	62	
	Ukupno	8	81	89	
	Osjetljivost (%)	62,50			
	Specifičnost (%)	72,84			

Tablica 12. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:16

	Serumi	VNT – nativni uzorci seruma, granični titar 1:16			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	4	23	27	0,171
	Negativni	1	61	62	
	Ukupno	5	84	89	
	Osjetljivost (%)	80,00			
	Specifičnost (%)	72,62			

U slučaju usporedbe rezultata ELISA i VNT izvođenog s nativnim uzorcima, kada se uzima ELISA kao zlatni standard, cohen kapa vrijednost se ne mijenja, a najveća osjetljivost VNT je pri vrijednosti granične vrijednosti titra 1:8 (18,52), a zatim pada (14,81) (tablice 13. – 18.).

Tablica 13. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT nula

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 0)	Pozitivni	5	14	19	-0,044
	Negativni	22	48	70	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	18,52			
	Specifičnost (%)	77,42			

Tablica 14. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:2

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 1:2)	Pozitivni	5	9	14	0,046
	Negativni	22	53	75	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	18,52			
	Specifičnost (%)	85,48			

Tablica 15. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:4

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 1:4)	Pozitivni	5	6	11	0,106
	Negativni	22	56	78	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	18,52			
	Specifičnost (%)	90,32			

Tablica 16. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:6

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 1:6)	Pozitivni	5	4	9	0,149
	Negativni	22	58	80	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	18,52			
	Specifičnost (%)	93,55			

Tablica 17. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:8

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 1:8)	Pozitivni	5	3	8	0,171
	Negativni	22	59	81	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	18,52			
	Specifičnost (%)	95,16			

Tablica 18. Osjetljivost i specifičnost VNT izvođenog s nativnim uzorcima seruma u usporedbi s ELISA metodom uz granični titar VNT 1:16

	Serumi	ELISA			Kappa test
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	κ
VNT (nativni uzorci seruma, granični titar 1:16)	Pozitivni	4	1	5	0,171
	Negativni	23	61	84	
	Ukupno	27	62	89	
	Osjetljivost (%)	14,81			
	Specifičnost (%)	98,39			

Usporedbom rezultata VNT toplinski inaktiviranih uzoraka s ili bez dodatka seruma i rezultata ELISA-e cohen kapa vrijednost je još niža, a osjetljivost ELISA-e u odnosu na ove dvije inačice VNT je 0% neovisno o graničnom titru (tablica 19. i 20.).

Tablica 19. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s inaktiviranim uzorcima seruma uz granični titar VNT 1:2

	Serumi	VNT – inaktivirani uzorci seruma, granični titar 1:2			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	0	22	22	-0,185
	Negativni	9	51	60	
	Ukupno	9	73	82	
	Osjetljivost (%)	00,00			
	Specifičnost (%)	69,86			

Tablica 20. Osjetljivost i specifičnost ELISA metode u usporedbi s VNT izvođenog s inaktiviranim uzorcima seruma s dodatkom seruma zamorčića uz granični titar VNT 1:2

	Serumi	VNT – inaktivirani uzorci seruma s dodatkom seruma zamorčića, granični titar 1:2			Kappa test κ
		Pozitivni	Negativni	Ukupno	
ELISA	Pozitivni	0	22	22	-0,149
	Negativni	7	53	60	
	Ukupno	7	75	82	
	Osjetljivost (%)	00,00			
	Specifičnost (%)	70,67			

5.2.3. Rezultati pretrage uzoraka seruma virus neutralizacijskim testom

Pretragom nativnih uzoraka seruma VNT, uz granični titar 1:8, pozitivno je bilo 32,02% jedinki od ukupnog broja pasa (n=206). U podjeli prema spolu, od ukupnog broja kuja (136 kuja) 44,85% je bilo seropozitivno, a od ukupnog broja mužjaka (67 mužjaka), 49,25% je bilo seropozitivno.

Kod jedinki koje su višekratno uzorkovane, seropozitivnim jedinkama smatrane su one jedinke koje su imale barem jedan pozitivan nalaz.

5.2.3.1. Čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalaenciju CaHV-1

U podjeli pasa s obzirom na veličinu uzgajivačnice, 95,38% seropozitivnih pasa (62 psa) i 75,36% seronegativnih pasa (104 psa) potječe iz velikih uzgajivačnica (tablica 21.).

Veličina uzgajivačnice ima značajan utjecaj ($p<0,01$) na broj seropozitivnih jedinki. Psi koji žive u velikim uzgajivačnicama bili su 6,76 puta češće seropozitivni nego psi koji žive u malim uzgajivačnicama (OR=6,76, 95% CI=1,99-22,92, $p<0,01$; χ^2 test: $\chi^2=10,94$, $p<0,001$; Fisher: $p<0,001$) (tablica 21.).

U podjeli pasa s obzirom na sudjelovanje na izložbama, 87,69% seropozitivnih pasa (57 pasa) i 53,44% seronegativnih pasa (70 pasa) je sudjelovalo na izložbama (tablica 21).

Sudjelovanje na izložbama značajno ($p<0,0001$) utječe na serološki status jedinke, odnosno, izložbeni psi imali su 6,21 puta češće pozitivni nalaz VNT od pasa koji nisu bili izlagani (OR=6,21, 95% CI=2,75-14,04, $p<0,0001$; χ^2 test: $\chi^2=22,35$, $p<0,001$; Fisher: $p<0,001$) (tablica 21.).

Uzimajući lov kao čimbenik rizika, u skupini seropozitivnih pasa 21,54% (14 pasa) je sudjelovalo u lovu kao i 4,38% u skupini seronegativnih pasa (šest pasa) (tablica 21.).

Lov značajno utječe ($p<0,001$) na broj seropozitivnih pasa, odnosno postoji 5,99 puta veća mogućnost da pas koji sudjeluje u lovu bude seropozitivan (OR=5,99, 95% CI=2,18-16,45, $p<0,001$; χ^2 test: $\chi^2=14,55$, $p<0,001$; Fisher: $p<0,001$) (tablica 21.).

U usporedbi na osnovi spola, u skupini seropozitivnih jedinki 69,23% su bile kuje (45 kuja). Spol nije imao utjecaj ($p=0,72$) na serološki status jedinki (OR=1.13, 95% CI=0,6-2,12, $p=0,72$; χ^2 test: $\chi^2=0,13$, $p=0,72$; Fisher: $p=0,75$) (tablica 21.).

Za dob, kao čimbenik rizika, dobivamo slijedeće podatake. U podjeli pasa po godinama (14 skupina pasa, svaka skupina je jedna godina, najmlađa skupina su psi mlađi od jedne godine a najstarija skupina su psi stari 13 godina) nema statistički značajne razlike u broju seropozitivnih jedinki (χ^2 test: χ^2=17,87, p=0,16). Kada se isključe skupine pasa iznad 10 godina, dobivamo sličan rezultat (χ^2 test: χ^2=13,45, p=0,2) (tablica 22.).

Uspoređujući seropozitivnost mlađih (do dvije godine) i starijih pasa (dvije i više godina), u skupini seropozitivnih pasa, 83,08% su stariji psi (54 psa). U skupini seronegativnih pasa, 71,74% su stariji psi (99 pasa) (tablica 21.).

Statistički, postoji tendencija (p=0,08, p<0,1) da u skupini pasa starih dvije godine i starijih ima veći broj seropozitivnih jedinki i 1,93 puta je veća mogućnost da životinje u navedenoj dobi budu seropozitivne (OR=1,93, 95% CI=0,92-4,08, p=0,08; χ^2 test: χ^2=3,06, p=0,08; Fisher: p=0,08) (tablica 21.).

S obzirom na provođenje dnevne dezinfekcije u uzgajivačnicama, 89,80% seropozitivnih (44 psa) i 56,38% seronegativnih pasa (53 psa) bilo je iz uzgajivačnica u kojima se ne provodi dnevna dezinfekcija (tablica 21.).

Izostanak provođenja dnevne dezinfekcije ima značajan utjecaj (p<0,001) na broj seropozitivnih jedinki. U uzgajivačnicama u kojim se ne provodi dnevna dezinfekcija psi su bili 6,81 puta češće seropozitivni nego u uzgajivačnicama koje provode dnevnu dezinfekciju (OR=6,81, 95% CI=2,48-18,71, p<0,001; χ^2 test: χ^2=16,48, p<0,001, Fisher: p<0,001) (tablica 21.).

Promatrajući utjecaj 16 različitih pasmina (pasmine su nabrojane u tablici 23) koje su sudjelovale u istraživanju, pronađeno je da postoji statistički značajna razlika u seropozitivnosti (χ^2 test: χ^2=37,37, p<0,01) (tablica 23.).

Također, u odnosu između 26 različitih uzgajivačnica u istraživanju, postoji statistički značajna razlika u broju seropozitivnih jedinki između različitih uzgajivačnica (χ^2 test: χ^2=87,23, p<0,001) (tablica 24.).

Zbog činjenice da se većina uzgajivačnica bavi uzgojem jedne pasmine, izračunata je korelacija između varijabli pasmina i uzgajivačnica. Između navedene dvije varijable pronađena je jaka povezanost (V = 0,72).

Pasmina labrador retrievera (kao najčešća pasmina u istraživanju) prisutna je u većem broju uzgajivačnica (17 uzgajivačnica). Analizom seropozitivnosti pasa pasmine labrador retriever po pripadnost pojedinoj uzgajivačnici, pronađena je statistički značajna razlika (p<0,001) u seropozitivnosti jedinki iz različitih uzgajivačnica (χ^2 test: χ^2=44,18, p<0,0010)

(tablica 24.). S obzirom na navedeno, postojanje korelacije između varijabli pasmina i uzgajivačnica te činjenice da ista pasmina uzgajana u različitim uzgajivačnicama pokazuje statistički značajnu razliku u razini seropozitivnosti jedinki, zaključeno je da pasmina nije neovisan čimbenik, nego da je ovisna o uzgajivačnici (tablice 24. i 25.).

Tablica 21. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa

Čimbenik rizika		broj pasa	Pozitivni	Negativni	Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
		n	%	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	p
Veličina uzgajivačnice	Velika Mala	203	95,38 4,62	75,36 24,64	6,76	1,99– 22,92	<0,01	10,94	<0,001	<0,001
Izložbe	Ne Da	196	87,69 12,31	53,44 46,56	6,21	2,75– 14,04	<0,0001	22,35	<0,001	<0,001
Lov	Da Ne	202	21,54 78,46	4,38 95,62	5,99	2,18 – 16,45	<0,001	14,55	<0,001	<0,001
Spol	m ž	203	69,23 30,77	66,67 33,33	1,13	0,6 – 2,12	0,72	0,13	0,72	0,75
Dob	*	203	*	*	-	-	-	17,87	0,16	-
Dob ≥2 godine / <2 godine	≥2 godine <2 godine	203	83,08 16,92	71,74 28,26	1,93	0,92– 4,08	0,08	3,06	0,08	0,08
Dnevna dezinfekcija	Da Ne	143	89,80 10,20	56,38 43,62	6,81	2,48– 18,71	<0,001	16,48	<0,001	<0,001
Pasmina	*	203	*	*	-	-	-	37,37	<0,01	-
Uzgajivačnice	*	203	*	*	-	-	-	87,23	<0,001	-

*podaci za dob, pasminu i uzgajivačnicu prikazani u tablici 10, 11 i 12

Tablica 22. Utjecaj dobi na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa. Prvi rezultat χ^2 testa odnosi se na sve dobne skupine (p=0,16), drugi rezultat se odnosi na skupinu pasa ≤10 godina starosti (p=0,2).

Dob pasa (godine)	broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	χ^2 test	
				χ^2	p
do 1	7	0,00	100,00	17,87	0,16
1	43	25,58	74,42	13,45	0,2
2	31	29,03	70,97		
3	30	40,00	60,00		
4	16	31,25	68,75		
5	20	35,00	65,00		
6	16	18,75	81,25		
7	12	33,33	66,67		
8	10	70,00	30,00		
9	8	25,00	75,00		
10	6	33,33	66,67		
11	1	100,00	0,00		
12	2	50,00	50,00		
13	1	100,00	0,00		

Tablica 23. Utjecaj pasmine na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa

Pasmina	broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	χ^2 test χ^2	p
Akita Inu	10	30,00	70,00	37,37	0,001
Argetinska doga	8	0,00	100,00		
Belgijski ovčar	8	0,00	100,00		
Njemački bokser	1	0,00	100,00		
Epanijel breton	2	100,00	0,00		
Engleski seter	1	100,00	0,00		
Oštrodlaki jazavčar	3	100,00	0,00		
Kavkaski ovčar	4	0,00	100,00		
Labrador retriever	119	38,66	61,34		
Mops	5	0,00	100,00		
Nizozemski ovčar	1	0,00	100,00		
Njemački ptičar	7	42,86	57,14		
Njemački ovčar	17	5,88	94,12		
Patuljasti pinč	1	0,00	100,00		
Shiba Inu	7	14,29	85,71		
Vajmarski ptičar	9	55,56	44,44		

Tablica 24. Utjecaj uzgajivačnice na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa

Oznaka uzgajivačnice	broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	χ^2 test χ^2	p
1-A	8	0,00	100,00	87,23	<0,001
2-B	13	46,15	53,85		
3-C	17	82,35	17,65		
4-CS	18	22,22	77,78		
5-Č	5	0,00	100,00		
6-Đ	3	0,00	100,00		
7-G	2	0,00	100,00		
8-H	9	11,11	88,89		
9-KO	4	0,00	100,00		
10-KR	2	0,00	100,00		
11-MP	5	0,00	100,00		
12-MO	26	3,85	96,15		
13-NjP	2	0,00	100,00		
14-OF	3	66,67	33,33		
15-OS	4	0,00	100,00		
16-P	5	0,00	100,00		
17-RR	16	56,25	43,75		
18-SI	13	69,23	30,77		
19-SP	4	0,00	100,00		
20-SW	3	33,33	66,67		
21-VP	16	68,75	31,25		
22-Y	17	23,53	76,47		
23-ZG	2	0,00	100,00		
24-ŽI	3	0,00	100,00		
25-ŽU	3	100,00	0,00		

Tablica 25. Odnos broja seropozitivnih jedinki između uzgajivačnica labrador retievera

Oznaka uzgajivačnice	Broj pasa n	Pozitivni		Negativni		χ^2 test	
		n	%	n	%	χ^2	p
2-B	13	6	46,15	7	53,85	44,18	<0,001
3-C	17	14	82,35	3	17,65		
4-CS	18	4	22,22	14	77,78		
5-Č	5	0	0,00	5	100,00		
6-Đ	3	0	0,00	3	100,00		
7-G	2	0	0,00	2	100,00		
8-H	9	1	11,11	8	88,89		
10-KR	2	0	0,00	2	100,00		
14-OF	3	2	66,67	1	33,33		
15-OS	3	0	0,00	3	100,00		
16-P	5	0	0,00	5	100,00		
17-RR	16	9	56,25	7	43,75		
18-SI	13	9	69,23	4	30,77		
19-SP	4	0	0,00	4	100,00		
20-SW	3	1	33,33	2	66,67		
23-ZG	2	0	0,00	2	100,00		
24-ŽI	1	0	0,00	1	100,00		
Ukupno	119	65		73			

5.2.3.2. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1

Protutijela za CaHV-1 su kratko prisutna u serumu pasa te različiti autori visinu titra protutijela koriste kao parametar koji ukazuje na nedavnu izloženost uzročniku ili reaktivaciju latentne infekcije (RONSSE i sur., 2002., RONSSE i sur., 2004., RONSSE i sur., 2005., DAHLBOM i sur., 2009., KROGENÆS i sur., 2012., LARA i sur. 2016.a.).

U velikim uzgajivačnicama srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 22,49 ± 2,07, u malim uzgajivačnicama 28,45 ± 2,92. Neovisno o veličini uzgajivačnice visina titra protutijela bila je podjednaka (p=0,74) (tablica 26.).

Od ukupnog broja pasa koji sudjeluju na izložbama srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 23,17 ± 2,10, a kod pasa koji ne sudjeluju na izložbama 19,85 ± 2,11. Visina titra protutijela nije se razlikovala kod pasa koji sudjeluju na izložbama (p=0,52) (tablica 26.).

Od ukupnog broja pasa koji sudjeluju u lovu srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 36,11 ± 2,31, a kod pasa koji ne sudjeluju u lovu 20,03 ± 1,94. Titar protutijela pasa koji sudjeluju u lovu statistički je značajno viši (p<0,01) (tablica 26.).

U podjeli po spolu, srednja vrijednost visine titra protutijela kod mužjaka bila je 20,71± 1,93 a kod kuja 23,70± 2,17. Nije pronađena statistički značajana razlika u visini titra protutijela između spolova (p=0,5) (tablica 26.).

Prema dobivenim podacima, između dobnih skupina nije bilo statistički značajne razlike u visini titra protutijela (p=0,28) (tablica 27.).

Srednja vrijednost visine titra protutijela pasa mlađih do dvije godine bila je 23,28± 1,73, a kod pasa starih dvije godine i starijih 22,63± 2,17. Niti u ovakvoj podjeli pasa po dobi nije pronađena statistički značajna razlika u visini titra protutijela između skupina (p=0,91) (tablica 26.).

Srednja vrijednost visine titra protutijela kod pasa koji žive u uzgajivačnici sa svakodnevnom dezinfekcijom bila je 16 ± 1,63. Kod pasa koji žive u uzgajivačnici u kojoj se ne provodi dnevna dezinfekcija, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 24,71± 2,12. Visina titra protutijela se nije statistički razlikovla u pasa iz uzgajivačnica u kojima se provodi odnosno ne provodi dnevna dezinfekcija (p=0,22) (tablica 26.).

Uz ograničenje koje je navedeno prije, da pasmina nije neovisna varijabla, između 16 različitih pasmina koje su sudjelovale u istraživanju, nije pronađena statistički značajna razlika u visini titra protutijela između jedinki različitih pasmina (p=0,08) (tablica 28.).

Također, u odnosu između 26 različitih uzgajivačnica u istraživanju dobiva se podatak da ne postoji značajna razlika u visini titra protutijela ovisno o uzgajivačnici (p=0,17) (tablica 29.).

Unutar uzgajivačnica labrador retrievera (kao najčešće pasmine u istraživanju, 17 uzgajivačnica) nije pronađeno da postoji značajna razlika u visini titra protutijela ovisno o pripadnost pojedinoj uzgajivačnici (p=0,32) (tablica 30.).

Tablica 26. Istraživani čimbenici rizika i visina titra CaHV-1 u svih pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Čimbenik rizika	Broj pasa n	Velika/Da/m/do 2 G ± GSD	Mala/Ne /ž/2 i više G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice	94	22,49± 2,07	28,45± 2,92	0,74
Izložbe	94	23,17± 2,10	19,85± 2,11	0,52
Lov	93	36,11 ± 2,31	20,03± 1,94	<0,01
Spol	94	20,71± 1,93	23,70± 2,17	0,50
Dob	94	*	*	0,28
Dob do/od 2	94	23,28± 1,73	22,63± 2,17	0,91
Dnevna dezinfekcija	70	16± 1,63	24,71± 2,12	0,22
Pasmina	94	*	*	0,08
Uzgajivačnice	94	*	*	0,17

*kategorije/vrijednosti prikazane su u zasebnim tablicama

Tablica 27. Dob i visina titra protutijela za CaHV-1 u svih pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Dob (godine)	broj pasa n	G ± GSD	p
do 1*	1	/	0,28
1	14	23,28 ± 1,73	
2	16	20,81 ±2,54	
3	17	22,08 ±2,17	
4	6	28,04 ±1,20	
5	9	31,85 ± 2,84	
6	9	36,11 ±1,69	
7	4	29,46 ±1,80	
8	7	12,44 ±1,93	
9	3	13,27 ±1,30	
10	5	13,56 ±2,11	
11*	1	23,00	
12*	1	64,00	
13*	1	32,00	

*isključen iz daljnje statističke analize

Tablica 28. Visina titra protutijela za CaHV-1 i pasmina pasa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Pasmina	Broj pasa n	G ± GSD	p
Akita Inu	7	17,79 ± 3,06	0,08
Epanijel breton	2	15,91 ± 1,68	
Engleski seter*	1	91,00	
Oštrodlaki jazavčar	3	28,24 ± 2,43	
Labrador retriever	65	20,54 ± 1,91	
Njemači ptičar	3	25,40 ± 2,88	
Njemački ovčar	4	16	
Shiba Inu	2	11	
Vajmarski ptičar	6	59,65 ± 1,67	

*isključen iz daljnje statističke analize

Tablica 29. Visina titra CaHV-1 protutijela u uzgajivačnicama. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Oznaka uzgajivačnice	Broj pasa n	G ± GSD	p
2-B	11	19,43 ± 1,54	0,17
3-C	15	20,39 ± 2,23	
4-CS	11	16 ± 1,76	
8-H	3	16	
12-MO	5	16	
14-OF	2	11,31 ± 1,63	
17-RR	11	28,38 ± 1,78	
18-SI	9	22,75 ± 1,80	
20-SW*	1	8,00	
21-VP	12	38,54 ± 2,26	
22-Y	9	15,78 ± 2,57	
25-ŽU	3	28,45 ± 2,92	

*isključen iz daljnje statističke analize

Tablica 30. Visina titra protutijela u uzgajivčnicama labrador retrievera. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (X ± SD)

Oznaka uzgajivačnice	X	SD	jednosmjerna ANOVA p
2-B	19,43	1,54	0,32
3-C	20,39	2,23	
4-CS	16	1,76	
8-H	16	-	
14-OF	11,31	1,63	
17-RR	28,38	1,78	
18-SI	22,75	1,80	
20-SW*	8,00	-	

*uzgajivačnice sa samo 1 pozitivnim psom su isključene iz analize (16-P, 19-SP, 20-SW)

5.2.3.3. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja

U velikim uzgajivačnicama 95,56% kuja je bilo seropozitivno (43 kuja) i 71,74% seronegativno (66 kuja) (tablica 31.).

Veličina uzgajivačnice ima značajan ($p<0,01$) utjecaj na seropozitivnost kuja. Kuje iz velikih uzgajivačnica imaju 15,65 puta češći seropozitivni nalaz od kuja koje žive u malim uzgajivačnicama (OR=8,47, 95% CI=1,91–37,53, $p<0,01$; χ^2 test: $\chi^2=10,54$, $p<0,01$; Fisher: $p<0,001$) (tablica 31.).

Od ukupnog broja kuja koje su sudjelovale na izložbama, 86,67% jedinki je bilo seropozitivno (39 kuja) i 52,33% seronegativno (45 kuja) (tablica 31.).

Kuje koje su prisustvovale izložbama imaju 8,47 puta češći seropozitivni nalaz od kuja koje ne odlaze na izložbe (OR=8,47, 95% CI=1,91–37,53, $p<0,01$; χ^2 test: $\chi^2=15,14$, $p<0,001$; Fisher: $p<0,001$), odnosno odlazak na izložbe značajno utječe na seropozitivnost kuja (tablica 31.).

Od ukupnog broja kuja koje su sudjelovale u lovu, 17,78% je bilo seropozitivno (osam kuja) i 5,49% seronegativno (pet kuja) (tablica 31.).

Lov značajno utječe ($p=0,03$) na broj seropozitivnih kuja, prisutna je 3,72 puta veća mogućnost da kuje koje sudjeluju u lovu bude seropozitivna, u odnosu na kuje koje ne idu u lov (OR=3,72, 95% CI=1,14–12,13, $p=0,03$; χ^2 test: $\chi^2=5,23$, $p=0,02$; Fisher: $p=0,03$) (tablica 31.).

U uzgajivačnicama u kojima se ne provodi dnevna dezinfekcija seropozitivno je bilo 88,57% kuja (31 kuja) i 56,90% seronegativno (33 kuje) (tablica 31.).

Neprovođenje dnevne dezinfekcija u uzgajivačnici značajno ($p<0,01$) utječe na broj seropozitvnih kuja, 5,87 puta je veća mogućnost da kuja bude seropozitivna ako se dnevna dezinfekcija u uzgajivačnici ne provodi (OR=5,87, 95% CI=1,83-18,8, $p<0,01$; χ^2 test: $\chi^2=10,21$, $p<0,01$, Fisher: $p<0,01$) (tablica 31.).

Tablica 31. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja

Čimbenik rizika		Broj kuja	Pozitivni	Negativni	Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
		n	%	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	p
Veličina uzgajivačnice	Velika	137	95,56	71,74	8,47	1,91– 37,53	p<0,01	10,54	<0,01	<0,001
	Mala		4,44	28,26						
Izložbe	Da	131	86,67	52,33	8,47	1,91– 37,53	<0,01	15,14	<0,001	<0,001
	Ne		13,33	47,67						
Lov	Da	136	17,78	5,49	3,72	1,14– 12,13	0,03	5,23	0,02	0,03
	Ne		82,22	94,51						
Dnevna dezinfekcija	Da	93	88,57	56,90	5,87	1,83– 18,8	<0,01	10,21	<0,01	<0,01
	Ne		11,43	43,10						

U podjeli kuja s obzirom da li su parene, dobivamo 8,89% seropozitivnih kuja koje nisu bile parene (četiri kuje) i 91,11% kuja koje su bile parene (41 kuja). Isto, u skupini seronegativnih kuja, 27,17% kuja su neparene (25 kuja) i 72,83% parenih kuja (67 kuja). Parenje značajno utječe na seropozitivnost kuja (OR=3,82, Cl=1,24-11,78, p=0,02; χ^2 test: χ^2=6,06, p=0,01; Fisher: p=0,01) (Tablica 32.)

Tablica 32. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom da li su parene

Kuje	Seropozitivne		Seronegativne		Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
	n	%	n	%	OR	95% Cl	p	χ^2	p	p
Neparene	4	8,89	25	27,17	3,82	1,24 - 11,78	0,02	6,06	0,01	0,01
Parene	41	91,11	67	72,83						
Ukupno	45	100	92	100						

Kada razlikujemo kuje koje nikada nisu bile parene (21,17%, 29 kuja), jednom (24,09%, 33 kuje) i više puta parene kuje (54,74%, 75 kuja) dobivamo slijedeći rezultat. U skupini seropozitivnih kuja, 8,89% nikada nije pareno (četiri kuje), 31,11% je jednom pareno (14 kuja) i 60,00% je pareno više puta (27 kuja). U skupini seronegativnih kuja, 27,17% nikada nije pareno (25 kuja), 20,65% je pareno jednom (19 kuja) i 52,17% je pareno više puta (48 kuja). Također, broj parenja značajno (p=0,04) utječe na broj seropozitivnih kuja (tablica 33.).

Tablica 33. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na broj parenja

Kuje – broj parenja	pozitivne		negativne			χ^2 test	
	n	%	n	%	ukupno	χ^2	p
0	4	8,89	25	27,17	28	6,48	0,04
1	14	31,11	19	20,65	33		
Više puta	27	60,00	48	52,17	75		

5.2.3.4. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u kuja

U velikim uzgajivačnicama srednja vrijednost visine titra protutijela je bila 23,39 ± 2,13, u malim uzgajivačnicama 31,64 ± 4,46. Neovisno o veličini uzgajivačnice razlika u visini titra protutijela u kuja nije bila statistički značajana (p=0,74) (tablica 34.).

Od ukupnog broja kuja koje su sudjelovale na izložbama, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 24,31 ± 2,16, a kod kuja koji nisu sudjelovale na izložbama 20,08 ± 2,39 te nije bilo statistički značajne tazlike (p=0,54) (tablica 34.).

Kod kuja koje idu u lov, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 51,35 ± 2,11 a kod kuja koji ne sudjeluju u lovu 20,05 ± 1,98. Kuje koje sudjeluju u lovu imaju statistički značajno viši titar protutijela (p<0,01) (tablica 34.).

Od ukupnog broja kuja koji žive u uzgajivačnici u kojoj se provodi dnevna dezinfekcija, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 16,00 ± 1,76, a kod kuja koji žive u uzgajivačnici u kojoj se ne provodi dnevna dezinfekcija bila je 26,82 ± 2,21, a razlika nije bila statistički značajna (p<=0,23) (tablica 34.).

Tablica 34. Istraživani čimbenici rizika i visina titra CaHV-1 u kuja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Čimbenik rizika	Broj kuja n	Velika/Da G ± GSD	Mala/Ne G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice	61	23,39 ± 2,13	31,64 ± 4,46	0,74
Izložbe	61	24,31 ± 2,16	20,08 ± 2,39	0,54
Lov	60	51,35 ± 2,11	20,05 ± 1,98	<0,01
Dnevna dezinfekcija	47	16,00 ± 1,76	26,82 ± 2,21	0,23

Srednja vrijednost visine titra protutijela ne parenih kuja bila je 22,44 ± 1,90, jednom parenih 24,26 ± 2,14 i više puta parenih kuja 23,62 ± 2,28. U podjeli kuja na one koje nisu parene i koje jesu parene, srednja vrijednost titra protutijela parenih kuja bila je 23,83 ± 2,21 te nije bilo statistički značajne razlike (tablica 35. i 36.).

Tablica 35. Odnos visine titra protutijela kuja s obzirom da li su parene

Kuje – broj parenja	G ± GSD	p
0	22,44 ± 1,90	1
1 i više puta	23,83 ± 2,21	

Tablica 36. Odnos visine titra protutijela kuja s obzirom na broj parenja

Kuje – broj parenja	G ± GSD	p
0	22,44 ± 1,90	0,98
1	24,26 ± 2,14	
Više puta	23,61 ± 2,28	

5.2.3.5. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka

Od ukupno 66 pretraženih seruma mužjaka, 30,30% je bilo seropozitivno (20 pasa) i 69,70% (seronegativno) 46 pasa.

U podjeli pasa prema veličini uzgajivačnice, iz velikih uzgajivačnica bilo je 95% seropozitivnih (19 mužjaka) i 82,61% seronegativnih mužjaka (38 mužjaka). Kod mužjaka veličina uzgajivačnice nije značajan čimbenik rizika u širenju CaHV-1 (OR=4, 95% CI=0,47–34,36, p=0,21; χ^2 test: χ^2=1,82, p=0,18; Fisher: p=0,26) (tablica 37.).

S obzirom na sudjelovanje na izložbama, 90% seropozitivnih (18 mužjaka) i 55,56% seronegativnih (25 mužjaka) mužjaka je sudjelovalo na izložbama. Mužjaci koji prisustvuju izložbama imaju 7,2 puta češće seropozitivni nalaz od mužjaka koji ne prisustvuju izložbama, odnosno, sudjelovanje na izložbama ima značajan utjecaj (p=0,01) na seropozitivnost

mužjaka (OR=7,2, 95% CI=1,49–34,77, p=0,01; χ^2 test: χ^2=7,34, p=<0,01; Fisher: p=<0,01) (tablica 37.).

S obzirom na sudjelovanje u lovu, 30% seropozitivnih (šest mužjaka) i 2,17% seronegativnih mužjaka je sudjelovalo u lovu. Lov ima značajan (p<0,01) utjecaj na seropozitivnost mužjaka, odnosno mužjaci imaju 19,29 puta veću mogućnost da budu seropozitivni ako sudjeluju u lovu (p=<0,01) (OR= 19,29, 95% CI=2,14–174,12, p=<0,01; χ^2 test: χ^2=11,38, p=<0,001, Fisher=<0,01) (tablica 37.).

S obzirom na provođenje dnevne dezinfekcije u uzgajivačnicama, 92,86% seropozitivnih mužjaka (13 pasa) i 55,56% seronegativnih mužjaka (20 pasa) bilo je iz uzgajivačnica u kojima se ne provodi dnevna dezinfekcija.

Izostanak provođenja dnevne dezinfekcije ima značajan utjecaj (p=0,03) na broj seropozitivnih jedinki. U uzgajivačnicama u kojim se ne provodi dnevna dezinfekcija psi su bili 10,4 puta češće seropozitivni nego u uzgajivačnicama koje provode dnevnu dezinfekciju (OR=10,4, 95% CI=1,23-88,18, p=0,03; χ^2 test: χ^2=6,25, p=0,01, Fisher: p=0,02) (tablica 37.).

Tablica 37. Istraživani čimbenici rizika i njihov utjecaj na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka

Čimbenik rizika		Broj mužjaka	Pozitivni	Negativni	Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
		n	%	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	p
Veličina uzgajivačnice	Velika	66	95,00	82,61	4	0,47 – 34,36	0,21	1,82	0,18	0,26
	Mala		5,00	17,39						
Izložbe	Da	65	90,00	55,56	7,2	1,49 – 34,77	0,01	7,34	<0,01	<0,01
	Ne		10,00	44,44						
Lov	Da	66	30,00	2,17	19,29	2,14 – 174,12	<0,01	11,38	<0,001	<0,01
	Ne		70,00	97,83						
Dnevna dezinfekcija	Da	50	92,86	55,56	10,4	1,23– 88,18	0,03	6,25	0,01	0,02
	Ne		7,14	44,44						
Broj parenja	*	66	*	*	-	-	-	14,35	<0,01	-

*kategorije/vrijednosti prikazane su u zasebnim tablicama

Od 66 mužjaka od kojih imamo anamnestičke podatke o parenju seropozitivno je 25% (pet mužjaka) koji nisu parili, 10% (dva mužjaka) koji su imali do 5 parenja, 15% (tri mužjaka) s 5 do 25 parenja i 50% (10 mužjaka) sa više od 25 parenja. Također, seronegativno je 52,17% (24 mužjaka) koji nisu parili, 15,22% (sedam mužjaka) koji su imali do 5 parenja, 23,91% (11 mužjaka) s 5 do 25 parenja i 8,70% (četiri mužjaka) sa više od 25 parenja. Pronađena je značajna razlika u broju seropozitivnih jedinki ovisno o broju parenja (χ^2 test: χ^2=14,35, p =<0,01), odnosno broj parenja utječe na seropozitivnost jedinke (tablica 38.).

Tablica 38. Utjecaj broja parenja na seroprevalenciju mužjaka

Broj parenja	Broj mužjaka n	Pozitivni %	Negativni %	χ^2 test	
				χ^2	p
0	29	25	52,17	14,35	<0,01
do 5	9	10	15,22		
5 do 25	14	15	23,91		
25+	14	50	8,70		

5.2.3.6. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka

Od ukupnog broja mužjaka koji sudjeluju na izložbama, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 20,88 ± 2,00 a kod mužjaka koji ne sudjeluju na izložbama 19,18 ± 1,29. Visina titra protutijela nije se statistički značajno razlikovala (p=0,85) (tablica 39.).

Od ukupnog broja mužjaka koji idu u lov, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 22,58 ± 2,15 a kod mužjaka koji ne sudjeluju u lovu 19,95 ± 1,89 bez statistički značajne razlike ove dvije vrijednosti (p=0,74) (tablica 39.).

Od ukupno 33 mužjaka, kod mužjaka koji nisu nikada parili (osam mužjaka) srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 19,46 ± 1,90, kod mužjaka koji su parili manje od pet puta (šest mužjaka) bila je 11,31 ± 1,63, kod mužjaka koji su parili 5-25 puta (osam mužjaka)

bila je 32,00 ± 2,00 i kod mužjaka koji su parili više od 25 puta (11 mužjaka) bila je 21,16 ± 1,96, a ove vrijednosti se nisu statistički značajno razlikovale (p=0,39) (tablica 40.).

Tablica 39. Istraživani čimbenici rizika i visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Čimbenik rizika	Broj mužjaka n	Velika/Da G ± GSD	Mala/Ne G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice	33	20,59 ± 1,97	23	-
Izložbe	33	22,88 ± 2,00	19,18 ± 1,29	0,85
Lov	33	22,58 ± 2,15	19,95 ± 1,89	0,74
Dnevna dezinfekcija	23	16,00	20,33 ± 1,87	-
Broj parenja	33	*	*	0,39

*kategorije/vrijednosti prikazane su u zasebnim tablicama

Tablica 40. Visina titra protutijela za CaHV-1 u mužjaka ovisno o broju parenja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Broj parenja	Broj pasa n	G ± GSD	p
0	8	19,46 ± 1,90	0,39
do 5	6	11,31 ± 1,63	
5 do 25	8	32,00 ± 2,00	
25+	11	21,16 ± 1,96	

5.2.3.7. Dodatna statistička analiza dobivenih podataka

U tablici 41. prikazan je utjecaj istraživanih čimbenika rizika na seroprevalenciju i visina titra protutijela u ukupnom broju pasa te zasebno kod mužjaka i kuja. Navedena značajnost (p) prikazana u tablici prikazuje vrijednost omjera izgleda (OR).

Tablica 41. Prikaz utjecaja (značajnost) istraživanih čimbenika rizika na seroprevalenciju i visina titra protutijela u ukupnom broju pasa, kod kuja i mužjaka

Čimbenik rizika	ukupno psi -p		Kuje -p		Mužjaci -p	
	seroprevalencija	titar	seroprevalencija	titar	seroprevalencija	titar
Veličina uzgajivačnice	<0,01	0,74	<0,01	0,74	0,21	-
Izložbe	<0,0001	0,52	<0,01	0,54	0,01	0,85
Lov	<0,001	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	0,74
Spol	0,72	0,50	-	-	-	-
Dob	0,2	0,28	-	-	-	-
Dob do/od 2	0,08	0,91	-	-	-	-
Dnevna dezinfekcija	<0,001	0,22	<0,01	0,23	0,03	
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	0,04	-	0,06	-	0,26	-
Lov, svi na izložbe	0,09	0,01	0,59	<0,01	0,05	0,63
Izložbe bez lova	<0,0001	0,47	<0,001	0,54	0,03	-
Pasmina	<0,001	0,08	-	-	-	-
Uzgajivačnice	<0,001	0,17	-	-	-	-
Uzgajivačnice labrador retrivera	<0,001	0,32	-	-	-	-
Broj parenja	-	-	0,04	-	<0,01	0,39

Kako bi se isključila mogućnost međusobnog prekrivanja utjecaja pojedinih čimbenika, napravljene su dodatne analize u kojima su pojedini čimbenici rizika isključeni.

S obzirom da je prethodnom analizom ustanovljeno da je prisustovovanje izložbama imalo značajan utjecaj na seropozitivnost pasa ($p<0,01$), ovaj čimbenik rizika je isključen iz daljnje analize kako bi isključili mogućnost njegovog utjecaja na druge čimbenike.

Veličina uzgajivačnice značajno utječe na broj seropozitivnih izložbenih pasa. Izložbeni psi koji potječu iz velikih uzgajivačnica (10 i više pasa) su 19,96 puta češće seropozitivni nego psi koji idu na izložbe, a potječu iz manjih uzgajivačnica (manje od 10 pasa) (OR= 19,96, 95% CI=1,14-348,5, $p=0,04$; χ^2 test: $\chi^2=8,84$, $p<0,01$; Fisher $p<0,01$) (tablica 42.).

Sudjelovanje pasa u lovu ima značajni utjecaj na broj seropozitivnih jedinki ($p<0,001$). Zbog navedenog, ispitan je utjecaj lova unutar skupine izložbenih pasa.

Odlazak u lov nema značajni utjecaj ($p=0,09$) ali ima tendenciju ($p<0,1$) da utječe na na broj seropozitivnih izložbenih pasa, odnosno 2,51 puta češće su seropozitivni izložbeni psi koji idu i u lov (OR=2,51, 95% CI=0,87-7,28, $p=0,09$; χ^2 test: $\chi^2=3,01$, $p=0,08$; Fisher $p=0,12$) (tablica 42.).

Kod pasa čija namjena je isključivo izložbena i ne sudjeluju u lovu, broj seropozitivnih pasa bio je 8,91 puta veći nego u pasa koji nisu odlazili na izložbe i ne sudjeluju u lovu (OR=8,91, 95% CI=3,32-23,92, $p<0,0001$; χ^2 test: $\chi^2=23,87$, $p<0,0001$; Fisher $p<0,0001$) (tablica 42.).

Tablica 42. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog njihovog mogućeg utjecaja na seroprevalenciju CaHV-1 u svih pasa

Čimbenik rizika		Broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	Omjer izgleda OR	95% CI	p	χ^2 test χ^2	p	Fisher p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	Velika	125	90,20	50,81	8,91	3,32– 23,92	<0,0001	23,87	<0,0001	<0,0001
	Mala		9,80	49,19						
Lov, svi na izložbe	Da	126	19,30	8,70	2,51	0,87– 7,28	0,09	3,01	0,08	0,12
	Ne		80,70	91,30						
Izložbe bez lova	Da	175	90,20	50,81	8,91	3,32 – 23,92	<0,0001	23,87	<0,0001	<0,0001
	Ne		9,80	49,19						

Bez obzira što je prethodnom analizom ustanovljeno kako izložbeni psi i oni koji ne sudjeluju na izložbama nemaju statistički značajnu razliku u visini titra protitijela (p=0,52), ovaj čimbenik rizika je isključen iz daljnje analize.

U velikim uzgajivačnicama srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 23,17 ± 0,32. Za male uzgajivačnice nemamo podatake, posljedično navedenome, nije bilo moguće napraviti statističku analizu.

U skupini pasa u kojoj svi idu na izložbe, ispitan je utjecaj odlazaka u lov. U ukupnom broju pasa koji su sudjelovali na izložbama i u lovu srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 38,54 ± 2,26, a kod pasa koji su sudjelovali na izložbama a nisu u lovu 20,52 ± 1,97. Psi koji sudjeluju u lovu imaju statistički značajno viši titar (p=0,01) (tablica 43.).

Kao i za prisustvovanje izložbama, u prethodnoj analizi je ustanovljeno da psi koji odlaze u lov imaju značajno viši titar protutijela (p=0,007). U ukupnom broju izložbenih pasa koji ne idu u lov srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 20,52 ± 1,97 a pasa koji nisu izložbeni i ne idu u lov bila je 16 ± 1,63. Visina titra proutijela između izložbenih pasa koji odlaze i ne odlaze u lov nije bila statistički značajna (p=0,47) (tablica 43.).

Tablica 43. Visina titra protutijela za CaHV-1 nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika.

Čimbenik rizika	Broj pasa n	Velika/Da G ± GSD	Mala/Ne G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	74	23,17 ± ,032	-	-
Lov, svi na izložbe	73	38,54 ± 2,26	20,52 ± 1,97	0,01
Izložbe bez lova	79	20,52 ± 1,97	16 ± 1,63	0,47

I u skupini kuja prethodnom analizom ustanovljeno je da prisustvovanje izložbama ima značaj utjecaj na broj seropozitivnih kuja (p<0,01), pa je ovaj čimbenik rizika je isključen iz daljnje analize, kao što smo predhodno naveli.

Veličina uzgajivačnice, u skupini izložbenih kuja, ima tendenciju da utječe (p=0,06) na broj seropozitivnih jedinki. Kuje, koje sudjeluju na izložbama iz velikih uzgajivačnica su imale 15,39 puta češće seropozitivni nalaz od kuja koje sudjeluju na izložbama, a iz manjih su

uzgajivačnica (OR=15,39, 95% CI=0,85-278,85, p=0,06; χ^2 test: χ^2=6,62, p=0,01; Fisher p=0,01) (tablica 44.).

Sudjelovanje kuja u lovu ima značajni utjecaj na broj seropozitivnih jedinki (p=0,03). Zbog navedenog, ispitan je utjecaj lova unutar skupine izložbenih kuja.

Odlazak u lov nema značajni utjecaj na broj seropozitivnih izložbenih kuja (OR=1,42, 95% CI=0,4-5,07, p=0,59; χ^2 test: χ^2=0,29, p=0,59; Fisher p=0,75) (tablica 44.)

Također, kako bi isključili utjecaj lova na rezultate, ispitan je utjecaj odlazaka na izložbe u skupini kuja u kojoj jedinke ne odlaze u lov.

U skupini u kojoj kuje ne odlaze u lov, ispitan je utjecaj odlazaka na izložbe. Odlazak na izložbe ima značajni utjecaj (p<0,001) na razliku u broju seropozitivnih kuja, odnosno broj seropozitivnih kuja je bio 8,67 puta veći nego u kuja koji nisu odlazili na izložbe (OR=8,67, 95% CI=2,81-26,76, p=<0,001; χ^2 test: χ^2=17,48, p<0,001; Fisher p<0,001) (tablica 44.).

Tablica 44. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog mogućeg prikrivanja utjecaja drugih čimbenika na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja

Čimbenici rizika		Ukupno kuje n	Pozitivni %	Negativni %	Omjer izgleda OR	95% CI	p	χ^2 test χ^2	p	Fisher p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	Velika	84	100,00	84,44	15,39	0,85– 278,85	0,06	6,62	0,01	0,01
	Mala		0	15,56						
Lov, svi na izložbe	Da	83	15,38	11,36	1,42	0,4– 5,07	0,59	0,29	0,59	0,75
	Ne		84,62	88,64						
Izložbe bez lova	Da	117	89,19	48,75	8,67	2,81– 26,76	<0,001	17,48	<0,001	<0,001
	Ne		10,81	51,25						

U skupini kuja u kojoj sve idu na izložbe, ispitana je visina titra protutijela u uzgajivačnicama različite veličine. U velikim uzgajivačnicama srednja vrijednost visine titra protutijela je 24,31 ± 2,16. U malim uzgajivačnicama bila je pristuna samo jedna jedinka te, posljedično tome, nije bilo moguće načiniti statističku analizu (tablica 45.).

U skupini kuja u kojoj sve idu na izložbe, ispitana je visina titra protutijela u odnosu na lov. U ukupnom broju kuja koji idu na izložbe i u lov, srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 60,35 ± 1,59, a kod kuja koji idu na izložbe, a ne sudjeluju u lovu 20,61 ± 2,012 te kuje koje idu u lov imaju statistički značajno viši titar ($p<0,01$) (tablica 45.).

Kao i za prisustvovanje izložbama, u prethodnoj analizi je također ustanovljeno da lovne kuje imaju značajno viši titar protutijela ($p<0,01$). Zbog navedenog, kako bi isključili utjecaj lova ispitan je titar protutijela u kuja ovisno o lovu. U ukupnom broju izložbenih kuja koji nisu odlazile u lov srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 20,61 ± 2,01 a u kuja koje nisu izložbene i nisu odlazile u lov je 16 ± 1,76. Statističkom obradom podataka je dobiveno je da nema statistički značajne razlike u visini titra protutijela (p=54) (tablica 45.).

Tablica 45. Visina titra protutijela za CaHV-1 u kuja nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Čimbenik rizika	Broj pasa n	Velika/Da G ± GSD	Mala/Ne G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	47	24,31 ± 2,16	-	-
Lov, svi na izložbe	46	60,35 ± 1,59	20,61 ± 2,01	<0,01
Izložbe bez lova	52	20,61 ± 2,01	516 ± 1076	0,54

U skupini mužjaka koji su sudjelovali na izložbama, bio je ispitan utjecaj veličine uzgajivačnice na broj seropozitivnih jedinki.

Veličina uzgajivačnice, unutar skupine izložbenih mužjaka, nije važan čimbenik rizika (p=0,26) niti značajno utječe na broj seropozitivnih mužjaka u uzgajivačnici (OR=5,76, 95% CI=0,28-118,7, p=0,26; χ^2 test: χ^2=2,32, p=0,1; Fisher p=0,25). (tablica 46.).

Lov ima značajni utjecaj na broj seropozitivnih mužjaka ($p<0,01$). Zbog navedenog, ispitan je utjecaj lova unutar skupine izložbenih mužjaka.

Postoji tendencija ($p<0,1$) da broj seropozitvnih izložbenih mužjaka raste ako idu u lov, odnosno postoji 9,23 puta veća mogućnost da budu seropozitivni (OR=9,23, 95% CI=0,97-87,64, p=0,05; χ^2 test: χ^2=4,93, p=0,03; Fisher p=0,07) (tablica 46.).

Također, kako bi isključili utjecaj lova na rezultate, ispitan je utjecaj odlazaka na izložbe u skupini mužjaka u kojoj jedinke ne odlaze u lov.

Odlazak na izložbe i dalje ima značajni utjecaj ($p<0,05$) na broj seropozitivnih mužjaka, odnosno da mužjaci čija je namjena isključivo izložbena su 10,83 puta češće seropozitivni (OR=10,83, 95% CI=1,3-90,14, p=0,03; χ^2 test: χ^2=6,75, p=<0,01; Fisher p=0,01) (tablica 46.).

Tablica 46. Isključivanje pojedinih čimbenika rizika zbog njihovog mogućeg utjecaja na seroprevalenciju CaHV-1 u mužjaka

Čimbenik rizika		Broj mužjaka	Pozitivni	Negativni	Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
		n	%	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	Velika	43	100,00	88,00	5,76	0,28 – 118,7	0,26	2,32	0,13	0,25
	Mala		0,00	12,00						
Lov, svi na izložbe	Da	43	27,78	4,00	9,23	0,97– 87,64	0,05	4,93	0,03	0,07
	Ne		72,22	96,00						
Izložbe bez lova	Da	58	92,86	54,55	10,83	1,3– 90,14	0,03	6,75	<0,01	0,01
	Ne		7,14	45,45						

Izložbeni mužjaci nisu imali značajno različitu visinu titra protitijela (p=0,85). Iz navedenog razloga ovaj čimbenik rizika je isključen iz daljnje analize.

U skupini mužjaka u kojoj svi psi idu na izložbe u velikim uzgajivačnicama srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 20,88 ± 2,00. U malim uzgajivačnicama ne postoji dovoljan broj jedinki za statističku obradu (tablica 47.).

U skupini mužjaka u kojoj svi idu na izložbe te u lov srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 22,50 ± 2,35 a kod mužjaka koji idu na izložbe a ne sudjeluju u lovu 20,29 ±1,93 te nema statistički značajne razlike između ovih vrijednosti (p=0,63) (tablica 47.).

U ukupnom broju izložbenih mužjaka koji ne idu u lov srednja vrijednost visine titra protutijela bila je 22,29 ± 1,93 a za mužjake koji nisu izložbeni i ne idu u lov nismo imali dovoljno podataka za statističku obradu (tablica 47.).

Tablica 47. Visina titra CaHV-1 u mužjaka nakon isključivanja pojedinih čimbenika rizika. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Čimbenik rizika	Broj mužjaka n	Velika/Da G ± GSD	Mala/Ne G ± GSD	p
Veličina uzgajivačnice, svi na izložbe	27	20,88 ± 2,00	-	-
Lov, svi na izložbe	27	22,50 ± 2,35	20,29 ± 1,93	0,63
Izložbe bez lova	27	20,29 ± 1,93	16	

Logističkom regresijom, u ukupnom broju pasa, analizirana je značajnost u broju seropozitivnih jedinki s obzirom na tri čimbenika rizika (sudjelovanje na izložbama, sudjelovanje u lovu i veličina uzgajivačnice). Sva tri navedena čimbenika rizika, logističkom regresijom (udio varijabilnosti R^2=0,25) imaju značajan utjecaj na broj seropozitvnih jedinki (sudjelovanje na izložbama (p<0,001), sudjelovanje u lovu (p<0,01) i veličina uzgajivačnice (p=0,03)) (tablica 48.).

Tablica 48. Logistička regresija za sve pse - seroprevalencija

Čimbenik rizika	n pasa	Omjer izgleda		p	R^2
		OR	95% CI		
Izložbe	196	4,37	1,88 – 10,16	0,0006	0,25
Lov		0,19	0,06 – 0,60	0,005	
Veličina uzgajivačnice		4,70	1,19 – 18,64	0,03	

Kada pse podjelimo u skupine s obzirom na spol, logističkom regresijom dobivamo sljedeće rezultate. Analizirana je značajnost u broju seropozitivnih kuja s obzirom na tri čimbenika rizika (sudjelovanje na izložbama, sudjelovanje u lovu i veličina uzgajivačnice).

Od tri navedena čimbenika rizika, logističkom regresijom (udio varijabilnosti R^2=0,23) značajan utjecaj na broj seropozitvnih jedinki imaju sudjelovanje na izložbama (p<0,01)i veličina uzgajivačnice (p=0,045), dok sudjelovanje u lovu nema značajnost (p=0,1) (tablica 49.).

Tablica 49. Logistička regresija za kuje – seroprevalencija

Čimbenik rizika	Broj kuja n	Omjer izgleda		p	R^2
		OR	95% CI		
Veličina uzgajivačnice	129	11,98	2,37 – 60,48	0,003	0,22
Izložbe		1,96	0,86 – 4,46	0,112	
Lov		3	0,67 – 13,42	0,151	

U skupini mužjaka, analizirana je značajnost logističkom regresijom s obzirom na dva čimbenika rizika (broj parenja i sudjelovanje u lovu). Oba navedena čimbenika rizika (udio varijabilnosti R^2=0,41) imaju statistički značajan utjecaj na broj serpozitivnih mužjaka ima samo (broj parenja (p<0,01)) i sudjelovanje u lovu (p<0,01) (tablica 50.).

Tablica 50. Logistička regresija za mužjake

Čimbenik rizika	Broj mužjaka n	Omjer izgleda		p	R^2
		OR	95% CI		
Broj parenja	66	2,03	1,24 – 3,34	0,005	0,31
Izložbe		2,69	0,78 – 9,31	0,119	
Lov		3,35	0,55 – 20,38	0,19	

5.2.3.8. Utjecaj faze ciklusa, graviditeta i laktacije na seroprevalenciju kuja te povezanost seroprevalencije s reproduktivnim poremetnjama

Ukupno je pretraženo 184 seruma kuja u različitim fazama spolnog ciklusa. U trenutku uzimanja uzoraka, seropozitivnih kuja u anestrusu bilo je 37,71% (82 kuje), u proestrusu 43,48% (23 kuje), u estrusu 78,57% (28 kuja) i u diestrusu 41,18% (51 kuja).

Tablica 51. Utjecaj faze spolnog ciklusa na seroprevalenciju CaHV-1 u kuja

Faza ciklusa	Broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	χ^2 test	
				χ^2	p
Anestrus	82	31,71	68,29	4,24	0,24
Proestrus	23	43,48	56,52		
Estrus	28	21,43	78,57		
Diestrus	51	41,18	58,82		

Nema značajne razlike u broju seropozitivnih kuja u usporedbi pojedinih faza spolnog ciklusa (χ^2 test: χ^2=4,24, p=0,24) (tablica 51.). Usporedba je rađena i između: anestrusa i ostalih faza spolnog ciklusa (OR=0,82, 95% CI=0,44–1,51, p=0,52; χ^2 test: χ^2=0,42, p=0,52; Fisher: p=0,54), proestrusa i ostalih faza spolnog ciklusa (OR=1,57, 95% CI=0,65–3,81, p=0,32; χ^2 test: χ^2=1, p=0,32; Fisher: p=0,35), estrusa i ostalih faza spolnog ciklusa (OR=0,47, 95% CI=0,78–1,24, p=0,13; χ^2 test: χ^2=2,41, p=0,12; Fisher: p=0,14) i diestrusa i ostalih faza spolnog ciklusa (OR=1,52, 95% CI=0,78 – 2,95, p=0,22; χ^2 test: χ^2=1,51, p=0,22; Fisher: p=0,23) (tablica 52.).

Tablica 52. Odnos seropozitivnosti u pojedinoj fazi spolnog ciklusa kuje (anestrus, proestrus, estrus i diestrus) u odnosu na seropozitivnost u ostalim fazama spolnog ciklusa

Faza ciklusa		Broj pasa n	Pozitivni %	Negativni %	Omjer izgleda OR	95% CI	p	χ^2 test χ^2	p	Fisher p
Anestrus	Anestrus	184	31,71	68,29	0,82	0,44 - 1,51	0,52	0,42	0,52	0,54
	Ostali		36,27	63,73						
Proestrus	Proestrus	184	43,48	56,52	1,57	0,65 – 3,81	0,32	1	0,32	0,35
	Ostali		32,92	67,08						
Estrus	Estrus	184	21,43	78,57	0,47	0,18 – 1,24	0,13	2,41	0,12	0,14
	Ostali		36,54	63,46						
Diestrus	Diestrus	184	41,18	58,82	1,52	0,78 – 2,95	0,22	1,51	0,22	0,23
	Ostali		31,58	68,42						

Nema značajne razlike u broju seropozitivnih kuja između: anestrusa bez laktacije i anestrusa s laktacijom (OR=1,06, 95% CI=0,3 – 3,74, p=0,93; χ^2 test: χ^2=0,01, p=0,93; Fisher: p=1), diestrusa s graviditetom i ostalih faza spolnog ciklusa (OR=1,65, 95% CI=0,75 – 3,60, p=0,21; χ^2 test: χ^2=0,57, p=0,21; Fisher: p=0,232), anestrusa s laktacijom i ostalih fazam spolnog ciklusa (OR=0,77, 95% CI=0,23 – 2,55, p=0,66; χ^2 test: χ^2=0,19, p=0,66; Fisher: p=0,78) i gravidnosti i laktacije s ostalim fazama spolnog ciklusa (OR=0,89, 95% CI=0,43 – 1,82, p=0,74; χ^2 test: χ^2=0,11, p=0,74; Fisher: p=0,86)

Jedino u diestrusu (bez gravidnosti) je bila prisutna tendencija (p=0,07) većeg broja seropozitivnih kuja (3 puta je veća mogućnost da kuje budu seropozitivne) nego u diestrusu s prisutnom gravidnosti (OR=3, 95% CI=0,93 – 9,7, p=0,07; χ^2 test: χ^2=3,46, p=0,06; Fisher: p=0,08) (tablica 53.).

Tablica 53. Utjecaj gravidnosti i laktacije na seroprevalenciju u kuja

		Broj kuja	Pozitivni	Negativni	Omjer izgleda			χ^2 test		Fisher
		n	%	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	p
Anestrus/laktacija	Anestrus	88	29,73	70,27	1,06	0,3 – 3,74	0,93	0,01	0,93	1
	Laktacija		28,57	71,43						
Diestrus/gravidnost	Diestrus	50	60	40	3	0,93 – 9,7	0,07	3,46	0,06	0,08
	Graviditet		33,33	66,67						
Gravidnost	Graviditet	189	33,33	66,67	0,97	0,43 – 2,22	0,95	0,004	0,95	1
	Ostali		33,96	66,04						
Laktacija	Laktacija	189	28,57	71,43	0,77	0,23 – 2,55	0,66	0,19	0,66	0,78
	Ostali		34,29	65,71						
Gravidnost + laktacija	Grav+lakt	189	31,82	68,18	0,89	0,43 – 1,82	0,74	0,11	0,74	0,86
	Ostali		34,48	65,52						

Nema ni statistički značaje razlike u visini titra protutijela između pojedinih faza spolnog ciklusa (p=0,46) (tablica 54.).

Tablica 54. Utjecaj faze spolnog ciklusa na visinu titra protutijela CaHV-1 u kuja. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Faza ciklusa	Broj kuja n	G ± GSD	p
Anestrus	33	14,72 ± 3,21	0,46
Proestrus	10	24,72 ± 1,70	
Estrus	7	25,30 ± 3,37	
Diestrus	29	15,84 ± 3,39	

Također, nije nađena statistički značajna razlika u visini titra protutijela u usporedbi pojedinog stadija ciklusa s ostalim fazama ciklusa (anestrus p=0,35, proestrus p=0,26, estrusu p=0,33 i diestrus p=0,69) (tablica 55.).

Tablica 55. Usporedba visine titra protutijela u pojedinoj fazi spolnog ciklusa. Rezultati su prikazani kao geomterijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Faza ciklusa	Broj pasa n	Faza ciklusa* G ± GSD	Ostale** G ± GSD	p
Anestrus	79	14,72 ± 3,21	18,74 ± 3,03	0,35
Proestrus	79	24,72 ± 1,70	16,04 ± 3,28	0,26
Estrus	79	25,30 ± 3,37	16,29 ± 3,08	0,33
Diestrus	79	15,84 ± 3,39	17,61 ± 2,97	0,69

* geomterijska sredina i geometrijska standardna devijacija visine titra protutijela pojedinog stadija ciklusa navedenog na lijevoj strani tablice;
** usporedba geometrijske sredine i geometrijske standardne devijacije visine titra protutijela pojedinog stadija ciklusa navedenog na lijevoj strani tablice sa ostalim fazama ciklusa navedenih u tablici

Usporedbom vrijednosti titra protutijela u kuja u anestrusu kojem nije predhodila gravidnost s vrijednosti titra protutijela kod kuja u anestrusu i predhodnom gravidnošću (odnosno s kujama u laktaciji) nije bilo statistički značajne razlike (p=0,236) u visini titra protutijela.

Također, usporedbom vrijednosti titra protutijela u kuja u diestrusu bez gravidnosti i diestrusu kada je kuja gravidna razlika (p>0,05, p=0,453) u visini titra protutijela nije bila značajna.

Usporedbom vrijednosti titra protutijela u kuja u gravidnosti i kuja koje nisu gravidne nije postojala značajna razlika (p>0,05, p=0,363) u visini titra protutijela kao ni u vrijednosti titra protutijela kod kuja u laktaciji i kuja izvan laktacije (p>0,05, p=0,343).

Na kraju, usporedbom vrijednosti titra protutijela u kuja koje su gravidne ili u laktaciji i kuja koje nisu ni gravidne niti u laktaciji, nije bilo značajne razlike (p>0,05, p=0,72) (tablica 56.).

Tablica 56. Prikaz utjecaja gravidnosti i laktacije na srednju vrijednost titra protutijela u kuja. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina ± geometrijska standardna devijacija (G ± GSD)

Utjecaj gravidnosti i laktacije	Broj kuja n	Titar protutijela* G ± GSD	Titar protutijela** G ± GSD	p
Anestrus bez laktacije* /laktacija**	33	14,29 ± 2,93	29,46 ± 4,51	0,24
Diestrus bez gravidnost*/gravidnost**	30	19,67 ± 2,99	13,99 ± 3,76	0,45
Gravidnost*/ bez gravidnosti**	82	13,99 ± 3,76	18,60 ± 2,88	0,36
Laktacija*/ bez laktacije**	80	29,46 ± 4,51	17,09 ± 2,99	0,34
Gravidnost + laktacija*/izvan gravidnosti i laktacije**	80	16,23 ± 3,88	18,03 ± 2,80	0,72

*,** geometrijska sredina i geometrijska standardna devijacija visine titra protutijela unutar pojedine faze spolnog ciklusa ili fiziološkog statusa kuje navedenog na lijevoj strani tablice

Reproduktivni poremećaji zabilježeni su u 46 kuja (33,82%) od kojih je 17 kuja (36,95%) bilo seropozitivno. Serološki status kuje nema značajan utjecaj na pojavu reproduktivnih problema (OR=0,99; 95% CI=0,38-2,11; p=0,8; χ^2=0,06; p=0,8; Fisher p=0,83) (tablica 57.).

Tablica 57. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na pojavu reproduktivnih problema

Kuje – reproduktivni problemi	Pozitivne	Negativne	ukupno	Omjer izgleda			χ^2		Fisher
				OR	Cl	p	χ^2	p	p
Da	17	29	46	0,9	0,38-2,11	0,8	0,06	0,8	0,83
Ne	17	26	43						

Prema vrsti reproduktivnih problema (uginuće štenadi, mali broj štenadi, patološki promjenjeni plodovi, izostanak koncepcije, mogućnost ranog pobačaja) i seropozitivnosti jedinke dobili smo sljedeće rezultate. Najčeši reproduktivni problem bio je uginuće štenadi (u 55,55% slučajeva), češći kod seronegativnih kuja. Mali broj štenadi u leglu i patološki promjenjeni plodovi javljali su se u 22,22% slučajeva (javljaju se kod tri seropozitivne i sedam seronegativnih kuja). Patološki promijenjeni plodovi u 6,66% slučajeva (kod jedne seropozitivne i dvije seronegativne kuje). Nemogućnost koncepcije kuje javljala se u 15,55% slučajeva, veći postotak bio je zabilježen kod seronegativnih kuja (kod šest kuja) nego kod seropozitivnih (jedna kuja).

Kod pojave reproduktivnih problema (uginuće štenadi, mali broj štenadi, patološki promjenjeni plodovi, izostanak koncepcije/mogućnost ranog pobačaja) ne nalazimo statističku značajnost (χ^2=63,9; p=0,27) u odnosu na serološki status kuje (tablica 58.).

Tablica 58. Odnos pojave uginuća štenadi, malog broja štenadi, patološki promijenjenih plodova i izostanka koncepcije kuja sa serološkim statusom kuje. Rezultati su prikazani kao broj kuja (n) i kao postotak (%) od ukupnog broja kuja sa reproduktivnim problemima

	Seropozitivne kuje	Seronegativne kuje	n	%	χ^2	
					χ^2	p
Uginuće štenadi	13	12	25	55,55	3,9	0,27
Mali broj plodova	3	7	10	22,22		
Patološki promjenjeni plodovi	1	2	3	6,67		
Kuja ne koncipira	1	6	7	15,56		
			45			

5.2.3.9. Serokonverzija

Serokonverzija i/ili promijena serološkog statusa zabiježena je u 14 jedinki (kod 11 kuja i tri mužjaka).

Više od jednog uzoraka seruma ispitano je kod 62 psa (48 kuja i 14 mužjaka), od kojih je 21 pas (15 kuja i šest mužjaka) ostao seropozitivan i 41 pas (33 kuje i osam mužjaka) seronegativan.

Zajedno sa sedam kuja i tri mužjaka s prisutnom serokonverzijom, i četiri kuje s promijenjenim serološkim statusom, od ukupnih 203 psa koji su sudjelovali u istraživanju, više puta je ispitano 76 psa (37,44% pasa). Od navedenog broja, 18,42% ponovno ispitanih pasa je promijenilo serološki status.

U skupini kuja, u sedam kuja zabilježena je serokonverzija. Šest seronegativnih kuja u slijedećem uzorkovanju su bile seropozitivne, kod tri kuje, nakon jednog negativnog rezultata, slijedila su dva pozitivna. Kod sedme kuje, nakon dva negativna rezultata slijedio je pozitivan rezultat.

Također, četiri kuje pokazale su velike razlike u serološkom statusu. Razlikujemo seronegativnu kuju kod koje u slijedećim testiranjima utvrđujemo dva pozitivna, te na kraju jedan negativan rezultat. Također, u istraživanju sudjeluje seropozitivna kuja, kojoj slijedi negativni serološki rezultat. Prisutna je i seropozitivna kuja s negativnim i ponovno sa pozitivnim rezultatom, i na kraju, kuja sa negativnim, pozitivnim i završno s negativnim rezultatom.

U skupini mužjaka, od ponovljenih 15 mužjaka, kod tri psa zabilježena je serokonverzija. Kod prvog mužjaka negativan rezultat slijedi dva pozitivna, kod drugog mužjaka negativan rezultat slijedi jedan pozitivan. Na kraju, kod trećeg mužjaka, nakon što negativan rezultat slijedi pozitivan, nastavljaju se dva negativna rezultata.

5.2.3.10. Cijepljenje

Istaživanjem je obuhvaćeno 40 kuja cijepljenih protiv CaHV-1. Od ukupnog broja cijepljenih kuja, 47,5% (19 kuja) je bilo seropozitivno.

Prema anamnestičkim podacima, kuje su bile podjeljene prema mjestu cijepljenja (u veterinarskoj ambulanti ili u uzgajivačnici). Na ovaj način želio se izbjeći utjecaj transporta i rukovanja s cijepivom u terenskim uvjetima. Ukupno 89,47% seropozitivnih (17 kuja) i 38,10% seronegativnih kuja (8 kuja) je bilo cijepljeno u veterinarskoj ambulanti. Cijepljenje kuja u ambulanti značajno utječe na seropozitivnost kuje (OR=13,81, 95% CI=2,5-76,33, $p<0,01$; χ^2 test: $\chi^2= 11,24$, $p<0,001$; Fisher: $p<0,01$) (tablica 59.).

Tablica 59. Prikaz odnosa seropozitivnosti cijepljenih kuja protiv CaHV-1 i utjecaj na seropozitivnost s obzirom da li je kuja cijepljena u veterinarskoj ambulanti ili izvan ambulante

Cijepljene kuje	Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		Omjer izgleda			χ^2		Fisher p
	n	%	n	%	OR	Cl	p	χ^2	p	
U ambulanti	17	89,47	8	38,10	13,81	2,5 - 76,33	<0,01	11,24	<0,001	<0,01
Izvan ambulante	2	10,53	13	61,90						
Ukupno	19		21							

U daljnoj statističkoj obradi bile su uzete samo kuje cijepljene u veterinarskoj ambulanti. Zbog činjenice da je vremenski period od cijepljenja do uzorkovanja izrazito širok (raspon od sedam dana do šest godina), u skupini seropozitivnih kuja bila je učinjena korelacija između visine titra protutijela i vremenskog perioda (u mjesecima) proteklog od cijepljenja.

U skupini seropozitivnih kuja koje su cijepljene u veterinarskoj ambulanti, dobivamo negativnu povezanost (r_s=-0,60; p=0,01), odnosno titar protutijela je bio značajno niži što je više vremena prošlo od cijepljenja.

Učinjena je korelacija između izmjerenog titra protutijela i broja cijepljenja, kako bi se utvrdilo ima li veći broj cijepljenja utjecaja na visinu titra protutijela. U skupini kuja cijepljnih u ambulanti ne dobivamo značajnost (r_s=0,09; p=0,72), odnosno broj cijepljenja statistički značajno ne utječe na visinu titra protutijela.

Korelacija je računana metodom po Spearmanu.

5.3. Rezultati molekularnih metoda

5.3.1. Rezultati metoda lančane reakcije polimerazom

Korištenom PCR metodom pretraženo je 528 uzoraka obrisaka (265 obriska nosa, 190 obrisaka rodnice i 75 obrisaka prepucija) i 99 ostalih uzoraka (organi štenadi, posteljice, vaginalni iscjedak nakon okota).

Svi uzorci obrisaka su bili negativni.

Od 99 ostalih uzoraka, pretraženi su bubrezi uginule štenadi, ukupno 36 bubrega porijeklom od 18 štenadi. Svi ispitani bubrezi su bili negativni. Ostali organi i posteljice nisu dalje ispitivani.

Prema metodi ugniježđene PCR - panherpes PCR (VANDEVANTER i sur., 1996.), dodatno je pretraženo 17 obrisaka. Odabrani su uzorci (obrisci) kuja i mužjaka porijeklom iz CaHV-1 pozitivnih uzgajivačnica. Deset pasa je imalo titar protutijela između 1:16 i 1:64. Šest pasa su bila seronegativna. Odabrano je 8 nosnih obrisaka (uzeta od 6 seropozitivnih i 2 seronegativna psa), 6 obrisaka rodnice (uzeti od 2 seropozitivne i 4 seronegativne kuje) te četiri obriska prepucija (uzeta od dva seropozitivna i jednog seronegativnog mužjaka).

Svih 17 obrisaka dalo je negativan rezultat (tablica 60.).

Tablica 60. Prikaz uzoraka koji su ponovljeni metodom ugnježđene lančane reakcije polimerazom (ugnježđena PCR)

mjesto uzimanja brisa	titar protutijela	spol	PCR nalaz
nos	1,64	ž	neg
nos	1,64	ž	neg
nos	1,32	ž	neg
nos	1,23	m	neg
nos	1,16	ž	neg
nos	1,16	ž	neg
nos	neg	ž	neg
nos	neg	ž	neg
rodnica	1,32	ž	neg
rodnica	1:45	ž	neg
rodnica	neg	ž	neg
rodnica	neg	ž	neg
rodnica	neg	ž	neg
rodnica	neg	ž	neg
prepucij	1,32	m	neg
prepucij	1,32	m	neg
prepucij	neg	m	neg

Uzročnik pseće herpesvirusne infekcije u obriscima (nosnom, rodničnom ili brisu prepucija) i u bubrezima uginule štenadi nije dokazan. Dobiveni proizvodi dobiveni PCR reakcijom nisu poslani na utvrđivanje slijeda nukleotida u Macrogen, Amsterdam, Nizozemska, niti je bilo moguće izraditi filogenetsku analizu terenskih sojeva CaHV-1.

5.4. Rezultati praćenja kasne faze skotnosti i okota

5.4.1. Praćene skotnosti u odnosu na serološki status skotnih kuja

Skotnost je praćena u 12 kuja, koje su podjeljene u skupine s obzirom na serološki status. Seropozitivne kuje smatrane su one kuje kod kojih je minimalno jedan serum seropozitivan. Od praćenih 12 kuja, devet kuja (75%) bilo je seropozitivno, a tri kuje (25%) su seronegativne. Od sakupljenih obrisaka, svi obrisci su seronegativni. Od pretraživanih izdvojenih bubrega uginule štenadi te pretraženog vaginalnog iscjedka, PCR metodom niti u jednom uzorku nije dokazan CaHV-1.

U kasnoj fazi graviditeta praćeno je 17 skotnosti u 13 kuja pasmine labrador retriever. Kod jedne kuje nema podataka vezano za njen serološki status, pa je isključena iz istraživanja. U navedenih 16 skotnosti oštenjeno je 112 štenadi (prirodnim putem 10 skotnosti i carskim rezom 6 skotnosti). Oštenjeno je 88 žive, vitalne štenadi i 24 malformirane, mrtvooštenjene, avitalne i/ili uginule štenadi u prvih 24 sata nakon okota.

S obzirom na način okota, u skupini seropozitivnih kuja, 66,67% (dvije kuje) su okotile prirodnim putem i 33,33% (jedna kuja) carskim rezom. U skupini seronegativnih kuja, 61,54% (osam kuja) su okotile prirodnim putem i 38,46% (pet kuja) carskim rezom.

Nije pronađena statistički značajna razlika u načinu okota kuje s obzirom na broj seropozitivnih kuja (OR=1,25; 95% CI=0,09-17,65; p=0,87; X^2 test p=0,87, Fisher p=1) (tablica 61.)

Tablica 61. Odnos seropozitivnih i seronegativnih kuja s obzirom na način okota. Rezultati su prikazani kao cijeli brojevi (n) i kao postotak (%).

Okot	Pozitivne kuje		Negativne kuje		Omjer izgleda			χ^2		Fisher
	n	%	n	%	OR	95% CI	p	χ^2	p	
Prirodan	2	66,66	8	61,54	1,25	0,09 - 17,65	0,87	0,03	0,87	1
Carski rez	1	33,34	5	38,46						
Ukupno	3									

Ukupan prosječan broj štenadi po okotu bio je 7 ± 2,85 (žive 5,5 ± 2,78 i 1,5 ± 1,89 mrtve štenadi). Kod seropozitivnih kuja, bilježimo 6,33 ± 0,58 žive štenadi i nula mrtve štenadi. Kod seronegativnih kuja, bilježimo 5,31 ± 3,07 žive i 1,85 ± 1,95 mrtve štenadi (tablica 62.).

Nema značajne razlike između broja žive štenadi i ukupnog broja štenadi s obzirom na serološki status kuje. Prisutna značajna razlika ($p<0,01$) između broja uginule štenadi, ovisno o serološkom statusu kuje mada je navedeni rezultat moguće posljedica malog broja podataka (tablica 62.).

Tablica 62. Ukupan broj štenadi, broj žive i uginule štenadi u odnosu na seropozitivnost kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)

Broj štenadi	Ukupno kuje	Seropozitivne kuje	Seronegativne kuje	p*
Žive	5,5 ± 2,78	6,33 ± 0,58	5,31 ± 3,07	0,28
Uginule	1,85 ± 1,95	0	1,85 ± 1,95	<0,01
Ukupno	7 ± 2,85	6,33 ± 0,58	7,15 ± 3,16	0,4

*razlika između seropozitivnih i seronegativnih kuja

Od ukupnog broja štenadi, razudba je napravljena kod 8 štenadi. Štenad je bila porijeklom od četiri kuje (kod jedne kuje iz dva različita legla). Dvije kuje su bile seropozitivne, jedna je bila seronegativna, a za jednu kuju nije utvrđen serološki status. Sve četiri kuje bile su multiparne i klasificirane u skupini kuja s reproduktivnim problemima. Od organa štendi, na CaHV-1 pretraženi su bubrezi PCR metodom opisanoj po DECARO i sur. (2010.). Niti jedan bubreg uginulog šteneta nije bio pozitivan na CaHV-1.

S obzirom na negativan PCR nalaz bubrega, nije se pristupalo PCR pretrazi posteljica.

5.4.2. Praćenje razine progesterona i rektalne temperature

Praćenje tijeka skotnosti počinjalo je 55. dan od prvog dana parenja, mjerenjem rektalne temperature i određivanjem razine progesterone iz seruma. Otvaranjem temperaturne liste istog dana počelo je mjerenje rektalne temperature četiri puta na dan. Prvo mjerenje je bilo u 7 ujutro, slijedilo je mjerenje u 12 sati, u 17 sati te zadnje mjerenje u 21 sat. Praćenjem 17 skotnosti učinjeno je 428 mjerenja rektalne temeprature.

Također, pratio se pad serumskog progesterona u zadnjih 48 sati pred očekivani okot. Dobivena srednja vrijednost brzine pada progesterona za sve praćene gravidnosti iznosila je dva dana pred okot 5,76 ± 3,39 ng/ml, jedan dan pred okot 3,92 ± 2,98 ng/ml i na dan okota 0,74 ± 0,29 ng/ml.

Kada praćene gravidnosti podijelimo u skupine s obzirom na seropozitivnost kuja, dobivamo sljedeće podatke. Kod seropozitivnih kuja, zabilježena razina serumskog progesterona bila je: dva dana pred okot 10,74 ± 1,10 ng/ml, jedan dan pred okot 7,81 ± 4,17 ng/ml i na dan okota 0,69 ± 0,25). Kod seronegativnih kuja, zabilježena razina serumskog progesterona bila je: dva dana pred okot 4,62 ± 2,56, jedan dan pred okot 3,02 ± 1,88 i na dan okota 0,69 ± 0,25. Razina serumskog progesterona je statistički značajno viša ($p<0,001$) jedino kod seropozitivnih kuja dva dana pred okot ali razlika jedan dan ($p=0,19$) i na dan okota ($p=0,50$) više nije značajna (tablica 63.).

Tablica 63. Prikaz brzine pada razine serumskog progesterona zadnja dva dana pred okot s obzirom na serološki status kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)

Dani pred okot	Razina serumskog progesterona (ng/ml)			
	Ukupno kuje	Seropozitivne kuje	Seronegativne kuje	p*
2	5,76 ± 3,39	10,74 ± 1,10	4,62 ± 2,56	<0,001
1	3,92 ± 2,32	7,81 ± 4,17	3,02 ± 1,88	0,19
Dan okota	0,74 ± 0,29	1,03 ± 0,47	0,69 ± 0,25	0,50

*razlika između seropozitivnih i seronegativnih kuja

Navedene vrijednosti dobivene su korištenjem t-testa. Praćenjem pada rektalne temperature pred okot dobili smo ujednačene rezultate, bez obzira na serološki status kuje. Pad rektalne temperature pred okot u prosjeku je bilježen 21,57 ± 6,86 sati pred okot (kod seropozitivnih kuja 18 ± 11,27 sati, kod seronegativnih kuja prosječno četiri sata ranije, 22,55 ±5,57 sati). Najniža zabilježena rektalna temperatura je u prosjeku 37,02 ± 0,24 °C (kod seropozitivnih kuja 36,87 ± 0,23 °C, a kod seronegativnih kuja 37,07 ± 0,24 °C). Razlika prosječne i najniže rektalne temperature je u prosjeku 0,49 ± 0,21 °C; kod seropozitivnih kuja 0,50±0,30 °C, a kod seronegativnih 0,48 ± 0,20 °C (tablica 64.).

Nema značajne razlike (p=0,34) između serološkog statusa kuje i broja sati pred okot kada je zabilježen pad rektalne temperature. Također, nema značajne razlike (p=0,27) između serološkog statusa kuje i razlike prosječne i najniže rektalne temperature. I na kraju, nema značajne razlike (p=0,93) između vrijednosti izmjerene najniže rektalne temperature između seropozitivnih i seronegativnih kuja (tablica 64.).

Navedene vrijednosti dobivene su korištenjem t-testa.

Tablica 64. Usporedba ukupnih vrijednosti brzine pada rektalne temperature pred okot, najniže rektalne temperature pred okot te razlike prosječne i najniže rektalne temperature pred okot i usporedba dobivenih podataka sa serološkim statusom kuje. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\overline{X}$) ± standardna devijacija (SD)

	ukupno kuje	seropozitivne kuje	seronegativne kuje	p
pad rektalne temperature - broj sati pred okot (h)	21,57 ± 6,87	18 ± 11,27	22,55 ± 5,57	p=0,57
najniža rektalna temperatura (°C)	37,02 ± 0,24	36,87 ± 0,23	37,07 ± 0,24	p=0,27
razlika prosječne i najniže rektalne temperature (°C)	0,48 ± 0,21	0,50 ± 0,30*	0,50 ± 0,20*	p=0,93

5.4.3. Ultrazvučno i rendgenološko praćenje kasne faze gravidnosti

Fetometrija je rađena kod šest kuja iste pasmine (labrador retriever), starosti 2,3 ± 0,8 godina. Kuje su porijeklom iz iste uzgajivačnice. Od šest kuja, dvije kuje su seropozitivne.

Od fetometrijskih mjerenja, mjeren je unutarnji promjer korionske šupljine (ICC) i promjer tjemenih kostiju (BPD).

Unutarnji promjer korionske šupljine mjeren je između 32. i 18. dana do okota. U ovom periodu učinjeno je ukupno 22 mjerenja, u sklopu šest ultrazvučnih pretraga. U navedenom periodu ukupna točnost je bila niska. Točnost predviđanja dana okota s greškom od: ±1 dan je 13,63% (seropozitivne kuje 20%, seronegativne kuje 11,76%), od ±2 dana je 31,81% (seropozitivne kuje 60%, seronegativne 23,53%) i od ±3 dana je 36,36% (seropozitivne kuje 80%, seronegativne 23,37%). Nema značajne razlike u točnosti predviđanja trenutka okota s obzirom na serološki status kuje, osim kod greške ±3 dana, kada je točnost značajno veća (p=0,04) kod seropozitivnih kuja (tablica 65.).

Tablica 65. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem unutarnjeg promjera korionske šupljine između 32. i 18. dana do okota

ICC (32. – 18. dana do okota)	Greška (dani do okota)	Ukupno kuje		Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		Fisher p
		Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	
	±1	3/22	13,63	1/5	20	2/17	11,76	1
	±2	7/22	31,81	3/5	60	4/17	23,53	0,27
	±3	8/22	36,36	4/5	80	4/17	23,53	0,04

U slučaju kada se u obzir uzimaju podaci mjerenja za unutarnji promjer korionske šupljine u rasponu od 32. do 25. dana do okota, dobiva se veća točost. Točnost predviđanja dana okota sa greškom od: ±1 dan je 25% (seropozitivne kuje 20%, seronegativne kuje 28,57%), ±2 dana je 58,33% (seropozitivne kuje 60%, seronegativne kuje 57,14%) i od ±3 dan je najveća, 66,67% (seropozitivne kuje 80%, seronegativne kuje 57,14%). I dalje nema

statistički značajne razlike u točnosti predviđanja trenutka okota s obzirom na seropozitivnost kuje (tablica 66.).

Tablica 66. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem unutarnjeg dijametra korionske šupljinea između 32. i 25. dana do okota

ICC (32. - 25. dana do okota	Greška (dani do okota)	Ukupno kuje		Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		Fisher p
		Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	
	±1	3/12	25	1/5	20	2/7	28,57	1
	±2	7/12	58,33	3/5	60	4/7	57,14	1
	±3	8/12	66,66	4/5	80	4/7	57,14	0,58

Kod mjerenja razmaka između dvije tjemene kosti, dobivamo sljedeće podatke. U rasponu od osam do dana okota, kod odstupanja od: ±1 dan točnost je od 30,77% (seropozitivne kuje 29,41 seronegativne kuje 31,25%) od ±2 dana točnost je od 41,54% (seropozitivne kuje 47,06%, seronegativne kuje 39,58%) i od ±3 dana točnost je od 58,46% (seropozitivne kuje 70,59%, seronegativne kuje 74,17%). Nema statistički značajne razlike u točnosti predviđanja trenutka okota s obzirom na seropozitivnost kuje (tablica 67.).

Tablica 67. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti između osam dana i dana okota

BPD (8. - 0 dana do okota)	Greška (dani do okota)	Ukupno kuje		Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		Fisher p
		Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	
	±1	20/65	30,77	5/17	29,41	15/48	31,25	1
	±2	27/65	41,54	8/17	47,06	19/48	39,58	0,78
	±3	38/65	58,46	12/17	70,59	26/48	54,17	0,27

U slučaju kada se u obzir uzimaju podaci mjerenja razmaka između dvije tjemene kosti u rasponu od osam do tri dana do okota, dobiva se veća točnost. Točnost predviđanja dana okota sa greškom od: ±1 dan je 40% (seropozitivne kuje 30,00%, seronegativne 43,33%), ±2 dan je 55% (seropozitivne kuje 50,00%, seronegativne 56,66%) i od ±3 dan je najveća, 72,5% (seropozitivne kuje 80,00%, seronegativne 70,00%) (tablica 68.).

Tablica 68. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti u periodu osam do tri dana pred okot

BPD (8. - 3 dana do okota)	Greška (dani do okota)	Ukupno kuje		Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		Fisher p
		Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	
	±1	16/40	40	3/10	30	13/30	43,33	0,71
	±2	22/40	55	5/10	50	17/30	56,66	0,73
	±3	29/40	72,5	8/10	80	21/30	70	0,7

U slučaju kada se u obzir uzimaju podaci mjerenja razmaka između dvije tjemene kosti u zadnja dva dana do okota, dobiva se izrazito niska točnost. Točnost predviđanja dana okota sa greškom od: ±1 dan je 16% (kod seropozitivnih kuja 28,57% i kod seronegativnih 11,11%), ±2 dan je 20% (kod seropozitivnih kuja 42,86% i kod seronegativnih 11,11%) i od ±3 dan je najveća, 36% (kod seropozitivnih kuja 57,14% i kod seronegativnih 27,78%) (tablica 69.).

Tablica 69. Točnost predviđanja dana okota mjerenjem razmaka između dvije tjemene kosti u periodu od dva dana do dana okota

		Ukupno kuje		Seropozitivne kuje		Seronegativne kuje		
BPD (2. - 0 dana do okota)	Greška (dani do okota)	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Točnost predviđanja / broj mjerenja	%	Fisher p
	±1	4/25	16	2/7	28,57	2/18	11,11	0,55
	±2	5/25	20	3/7	42,86	2/18	11,11	0,11
	±3	9/25	36	4/7	57,14	5/18	27,78	0,2

Rendgenološki snimljeno je 17 skotnosti u 13 kuja pasmine labrador retriever. Sve snimke rađene su 55. dana gravidnosti. Snimano je dva položaja (u leđnom i bočnom položaju) i ukupno je analizirano 34 snimka.

Niti na jednoj rendgenološkoj snimci nije bila vidljiva patologija ploda (uginuće ploda u maternici, prisutnost malformiranog ploda). Također, nije nađena patologija koja bi ukazivala na moguću distociju. Nakon navedenih 17 skotnosti oštenjeno je 118 štenadi, prirodnim putem 10 legla i carskim rezom sedam legla. Oštenjeno je 94 žive, vitalne štenadi i 24 malformirane, mrtvooštenjene, avitalne i/ili uginule štenadi u prvih 24 sata nakon okota.

6. RASPRAVA

Danas je neosporno da je infekcija CaHV-1 jedna od najrasprostranjenijih zaraznih bolesti pasa širom svijeta. Podaci o seroprevalenciji se značajno razlikuju od istraživanja do istraživanja i bez sumnje osnovni je razlog nepostojanje opće prihvaćenog standarda u serološkoj dijagnostici CaHV-1. Odgovarajuća dijagnostika je osnova praćenja, ali i kontrole pojave i širenja svake zarazne bolesti. Ovo je osobito važno u slučaju infekcije CaHV-1 koja zbog nastanka latentne infekcije može vrlo dugo perzistirati u uzgojima i nanositi značajne uzgojne i ekonomske gubitke.

Dvije najčešće korištene metode za dokazivanje prisutnosti protutijela za CaHV-1 u uzorcima seruma su imunoenzimni test (ELISA) i virus neutralizacijski test (VNT).

Osnovni nedostatci koji se navode kod VNT, neovisno o zaraznoj bolesti u čijoj dijagnostici se koriste, je dug vremenski period do dobivanja rezultata, ali i složenost metode koja zahtjeva izvođenje u visoko specijaliziranim laboratorijima koji koriste stanične kulture u rutinskom radu. U dijagnostici CaHV-1 VNT ima izrazitu specifičnost te se navodi i kao zlatni standard. Međutim, nedostatak ove metode je relativno niska osjetljivost metode te su mogući lažno negativni rezultati (RONSEE i sur., 2004., YESILBAG i sur., 2012.). Kako bi se povećala osjetljivost VNT za dokaz CaHV-1 u stanični hranjivi medij dodaje se komplement zamorčića (CARMICHAEL i sur., 1970., READING i FIELD, 1998.). Ovo je od ranije poznata izmjena postupka izvođenja VNT koja omogućava dokaz neutralizacijskih protutijela ovisnih o komplementu (DOZIOS i sur., 1949.), a pokazala se osobito učinkovitom kod VNT za dokaz herpesvirusnih infekcija u različitih životinja i ljudi (SHIKAI i HOSHINO, 1975., LEDDY i sur., 1977.). Novija istraživanja, međutim, navode da se dodavanjem komplementa ne povećava osjetljivost VNT u dijagnostici CaHV-1 infekcije u pasa (RONSSE i sur., 2002.). Promjenom kulture stanica koja se koristi za umnažanje CaHV-1 (READING i FIELD, 1999.) opisano je skraćivanje potrebnog vremena za izvođenje VNT, ali ne i osjetljivost testa.

Za potrebe istraživanja VNT je razvijen i standardiziran u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu modifikacijom i međusobnom usporedbom ranije opisanih postupaka (READING i FIELD, 1999., RONSSE i sur., 2002.).

Ovim istraživanjem je određen broj MDCK stanica te koncentracija CaHV-1 standardne virusne doze koje daju optimalne rezultate. Poseban doprinos u pogledu dijagnostike infekcije CaHV-1 daje usporedba tri inačice metode VNT u kojima su ispitivani nativni, toplinski inaktivirani i toplinski inaktivirani uzorci seruma s dodatkom komplementa

zamorčića. Prema podacima iz dostupne literature, ovo je prvi puta da se načini usporedba i VNT koristeći nativne uzorke. Nedvojbeno je pokazano da je pretraga nativnih uzoraka seruma osjetljivija metoda pretrage uzoraka s više od jednim dvostrukim razrijeđenjem višim titrom u odnosu na titar protutijela dobivenih pretragom toplinski inaktiviranih uzoraka seruma i gotovo pola dvostrukog razrijeđenja većim titrom u odnosu na titar dobiven pretragom toplinski inaktiviranih uzoraka seruma uz dodatak komplementa zamorčića (nativni uzorci su u prosjeku imali 3,13 dvostrukih razrijeđenja do konačnog titra protutijela za CaHV-1 u uzorku, za razliku od 2,06 kod toplinski inaktiviranih i 2,73 kod toplinski inaktiviranih uz dodatak komplementa zamorčića). U konačnici stupanj korelacije dobivenih titrova protutijela za CaHV-1 za nativne i toplinski inaktivirane uzorake seruma bio je $r=0,81$ ($p<0,001$), za nativne i toplinski inaktivirane uzorke seruma s dodatkom komplementa $r=0,82$ ($p<0,001$) te za toplinski inaktivirane uzorke seruma bez i s dodatkom komplementa $r=0,82$ ($p<0,001$), što je visok stupanj korelacije uz visoku statističku značajnost te će izbor metode uvijek rezultirati u različitim vrijednostima visine titra i to se mora uzeti u obzir kod tumačenja rezultata VNT u različitim dijagnostičkim laboratorijima.

Da bi se dalje načinila validacija VNT načinjena je usporedba sva tri oblika VNT s ELISA-om. ELISA je danas vrlo često korištena serološka metoda u dijagnostici velikog broja zaraznih bolesti. Brzina dobivanja rezultata, jednostavnost izvođenja te mogućnost automatizacije postupka i pretraživanja velikog broja uzoraka istodobno su opće poznate prednosti ove metode. U slučaju dokaza infekcije CaHV-1 prednost ELISA u odnosu na VNT je i neovisnost izvođenja pretrage o radu sa staničnim kulturama, citotoksičnom učinku uzoraka seruma te bakterijskoj kontaminaciji uzoraka (YESILBAG i sur., 2012.). Osim navedenog, ELISA je imala i veću osjetljivost u odnosu na VNT kod toplinski inaktiviranih uzoraka i inaktiviranih uzoraka s dodatkom komplementa (RONSSE i sur., 2002, LARA i sur., 2016.a.). LARA i sur. (2016.a.), koristeći isti komercijalni komplet koji je korišten u ovom istraživanju („Canine Herpes Virus Antibody ELISA“ (B. V. European Veterinary Laboratory, Woerden, Nizozemska), opisuju nisku podudarnost rezultata VNT i ELISA-e (cohen's kapa=0,1129). Ova niska korelacija rezultata odgovara kapa vrijednosti dobivenim za VNT i ELISA-u u ovom istraživanju, međutim ovdje je usporedno pretraženo 89 uzoraka, a LARA i sur. (2016.a.) su pretražili svega 20. Za razliku od istraživanja LARA i sur. (2016.a.) 15,73% nativnih uzoraka seruma imalo je neutralizirajuća protutijela, a ELISA su bili negativni te je posljedično osjetljivost ELISA-e bila niska i iznosila 26,32%. Nisku osjetljivost ELISA-e opisali su i READINGAND i FIELD (1998.) u 2% inaktiviranih seruma uz dodatak komplementa. Čak i u izvornom istraživanju, u kojem je prvi put upotreljena

ELISA za dokaz CaHV-1 protutijela, 0,4% inaktiviranih seruma uz dodatak komplementa je bilo ELISA negativno, uz pozitivan VNT nalaz (TAKUMI i sur., 1989.). U ovom istraživanju 8,53% inaktiviranih seruma uz dodatak komplementa zamorčića i 10,98% inaktiviranih seruma bez dodatka komplementa imali su neutralizirajuća protutijela iako su ELISA bili negativni. Međutim, valja napomenuti da je korištena ELISA temeljena na dokazivanju IgG protutijela te za razliku od VNT ne prepoznaje rani stadij infekcije u kojoj prevladavaju IgM protutijela. Nadalje, ne treba isključiti i moguće križne reakcije primjenom VNT unatoč specifičnosti metode. Neutralizacijski antigeni CaHV-1 se nalaze u većem broju virusnih proteina, a glikoprotein B je dominantan antigen u imunosnom odgovoru (XUAN i sur., 191.; XUAN i sur., 1992.). Danas su dostupni ELISA komercijalni kompleti kod kojih se na mikrotitracijsku pliticu adsorbiraju proteini cijele virusne čestice ili kompetitivne ELISA-e kod kojih se na plitici nalaze monoklonska protutijela za glikoprotein B (RIJSEWIJK i sur., 1999., RONSSE i sur., 2002., YESILBAG i sur., 2012., MUSAYEVA i sur., 2013.). Da bismo izbjegli nižu osjetljivost ELISA-e, kao posljedicu neutralizirajućih protutijela koja su specifična za antigene koji se nalaze na drugim virusnim proteinima, osim glikoproteina B, odlučili smo se za ELISA komplet koji je proizveden od cijele virusne čestice. Po drugoj strani dokazana je mogućnost infekcije pasa FHV-1. Osim moguće infekcije pasa FHV-1 dokazano je i da FHV-1 antiserum može neutralizirati CaHV-1, ali ne i obrnuto (ROTA i MAES, 1990.). Ono što je bitno naglasiti križna neutralizacija je samo djelomična te se niski titrovi VNT (1:2) mogu pripisati infekciji datog psa FHV-1 (READINGAND i FIELD 1998.). Kako bi ovo bilo izbjegnuto granični titar pozitivnog VNT određen je na 1:8. Ovo je i bila vrijednost pri kojoj je sukladnost rezultata ELISA-e i VNT bila najveća (cohen's kappa=0,171). Međutim od svih uzoraka usporedno pretraženih ELISA-om i VNT 3,37% imalo je titar neutralizirajućih protutijela veći od 1:8, a negativan rezultat ELISA-e. Ovaj postotak se nije statistički značajno mijenjao, pri ovom graničnom titru, ovisno o toplinskoj inaktivaciji uzoraka seruma i dodatku komplementa. Po drugoj strani, utjecaj antigenske srodnosti FHV-1 i CaHV-1 na rezultate ELISA-e nije ispitan prema podacima iz dostupne literature te je nemoguće odrediti koliki je udio pasa koji imaju ELISA pozitivan rezultat bio inficiran FHV-1. Zaključno rezultati ovog istraživanja govore da je metoda izbora u serološkoj dijagnostici VNT, a za pretraživanje trebalo bi koristiti nativne uzorke. Po drugoj strani podaci govore da je potrebno iznaći rješenja za nedostatke trenutačno dostupnih komercijalnih ELISA kompleta.

U sljedećoj fazi ovog istraživanja prikupljeni obrisci nosne sluznice, prepucija i stidnice pretraženi su na prisutnost virusne DNK PCR metodom kako bi se neposredno

dokazalo moguće izlučivanje CaHV-1 i njegovo kruženje u uzgajivačnici. Metoda PCR-a je bila metoda izbora zbog daleko veće osjetljivosti u odnosu na izolaciju uzročnika iz kliničkog materijala na staničnim kulturama **(**POSTE i KING, 1971., APPEL, 1987., GRANCHAMPS, 1998.). Isto je tako poznato da se neovisno o ulaznim vratima infekcije uzročnik može dokazati u obrisku nosne sluznice (MIYOSHI i sur., 1999.) te u obriscima prepucija i stidnice u klinički manifestnoj fazi akutne infekcije (HASHIMOTO i sur., 1983.). Sljedeća činjenica koja je bila uzeta u obzir je aktivacija latentne infekcije u stanjima povećanog stresa što su u uzgojnih životinja prvenstveno estrus i porod (EVERMAN 1989., OKUDA i sur. 1993., BURR i sur., 1996., READING i FIELD, 1998.). Poseban su slučaj pobačena i mrtvorođena štenad u kojih se virus može dokazati u sveukupnoj DNK parenhimskih organa (HASHIMOTO i sur., 1983., LARA i sur., 2016.b.).

U ovom istraživanju pretraženi su obrisci nosne sluznice i obrisci prepucija odnosno rodnice kako bi se povećala mogućnost dokaza izlučivanja. Ukupno je pretraženo 528 obrisaka podrijetlom od 203 životinje te parenhimski organi 18 mrtvorođene štenadi i pobačenih plodova. Niti jedan od pretraženih uzoraka nije dao pozitivnu reakciju neovisno o serološkom statusu pretražene jedinke. Navedeni rezultat je u suglasju s rezultatima istraživanja drugih autora. RONSSE i sur. (2005.) te PRATELLI i sur. (2014.) ne dokazuju CaHV-1 niti u jednom brisu rodnice, kao ni STRÖM HOLST i sur. (2012.). STRÖM HOLST i sur. (2012.) navode zaključak da je CaHV-1 uobičajena infekcija kod pasa u Švedskoj i da promjene u titru protutijela nisu povezane s izlučivanjem CaHV-1 preko sluznice rodnice. U novijim istraživanjima (BOTTINELLI i sur., 2016.) također nije dokazano izlučivanje virusa preko sluznice rodnice tijekom estrusa i u periodu nakon okota kuja. I u ovom istraživanju ciljano su uzorkovani te pretraženi obrisci nosne sluznice te obrisci rodnice 28 životinja u estrusu, četiri kuje neposredno nakon poroda te 16 kuja u laktaciji, koja je neosporno izraziti metabolički stres za kuju. Svi uzorci bili su negativni na prisutnost virusne DNK isto kao i uzorci podrijetlom od muških životinja koji su u svim slučajevima uzimani u razdoblju kada se u uzgajivačnici nalazi kuja u proestrusu ili estrusu, ciljajući na stres mužjaka. Osnovni razlog za dobivene rezultate koji se navodi u dostupnoj literaturi je izrazito kratko vrijeme izlučivanja virusa kod aktivacije latentne infekcije. Vrijeme aktivnog izlučivanja CaHV-1 bilo je 2-6 dana prilikom prirodne infekcije te 2-9 dana u pokusnim infekcijama (OKUDA i sur., 1993.). Daleko veća mogućnost izolacije virusne DNK je tijekom akutne faze infekcije. U odraslih pasa prilikom infekcije CaHV-1 dolazi do razvoja vezikularne upale sluznice stidnice i rodnice i upale sluznice glavića penisa i prepucija. Genitalne lezije nestanu kratko nakon infekcije ali se mogu ponovno pojaviti s početkom proestrusa (POSTE i KING, 1971.),

međutim prilikom uzimanja briseva rodnice te briseva prepucija, vezanih za ovo istraživanje, nije zabilježena prisutnost genitalnih lezija niti u jedne životinje.

Također nije dokazana DNK psećeg herpesvirusa 1 iz bubrega, pluća, jetre i slezene mrtvorođene štenadi i pobačenih plodova dostupnih u ovom istraživanju. U Danskoj su LARSEN i sur. (2015.) prisutnost DNK CaHV-1 dokazali u 22,8% štenadi (n=13) od 57 uginule štenadi i LARA i sur. (2016.b.) u Meksiku u tri šteneta. Međutim opsežnija istraživanja pokazuju da infekcija CaHV-1 nije značajan uzrok uginuća novorođene štenadi niti pobačaja u kuja (GILL, 2001., INDREBØ i sur., 2007., MÜNNICH, 2008.) te negativni rezultat pretrage svega 18 mrtvih štenadi i pobačenih plodova u ovom istraživanju ne iznenađuje.

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 25 uzgajivačnica s ukupno 203 psa (136 kuja i 67 mužjaka). Najniža vrijednost titara protutijela koja se smatra pozitivnim nalazom razlikuje se ovisno o istraživanju, međutim zbog ranije navedenog, u ovom radu, seropozitivnom jedinkom smatrana je svaka jedinka kod koje su dokazana protutijela za CaHV-1 u titru 1:8 i više.

Seroprevalencija CaHV-1 u pasa iz ovog istraživanja bila je 32,0%. Ovdje se mora naglasiti da se dobivena seroprevalencija odnosi na pse isključivo držane u uzgajivačnicama, a ne pojedinačno te može poslužiti samo kao gruba procjena seroprevalencije CaHV-1 u populaciji pasa u Republici Hrvatskoj. I drugi autori opisuju različiti postotak seropozitivnih pasa u uzgajivačnicama u odnosu na pse koji su držani pojedinačno. YESILBAG i sur. (2012.) opisuju seroprevalenciju od 39% u individualno držanih pasa i seroprevalenciju od 62,1% u pasa držanih u skupini. MUSAYEVA i sur. (2013.) opisuju sedam puta veću seroprevalenciju u uzgajivačnicama nego kod pojedinačno držanih pasa. DAHLBOM i sur. (2009.) opisuju 81,5% seroprevalenciju u pasa iz uzgajivačnica.

U Rumunjskoj je utvrđena visoka seroprevalencija (86,6%) u pasa iz uzgajivačnica (COBZARIU i sur., 2018.) te niska seroprevalencija (22,55%) u pojedinačno držanih pasa (CHELARU, 2014). Također, u Meksiku (LARA i sur., 2016.a.) utvrđena je visoka seroprevalencija (87%) u pasa držanih u uzgajivačnici.

S druge strane osnovu da se koristi dobivena vrijednost seroprevalencije kao procjena seroprevalencije u općoj populaciji daju rezultati RONSSE i sur. (2002.) koji pokazuju jednaku pojavnost CaHV-1 i kod pasa držanih u uzgajivačnicama i kod pojedinačno držanih životinja.

U serološkoj dijagnostici CaHV-1 otežavajući čimbenik je moguća pojava serokonverzije i to u oba smjera. U ovom istraživanju, u skupini pasa kojima je serološki status ispitan više puta, od 76 jedinki oba spola (37,44% od ukupnog broja pasa) 18,42% jedinki je promijenilo serološki status. Ovaj problem je osobito izražen u kuja jer uzorak serološki pozitivne životinje u jednoj fazi spolnog ciklusa ne mora biti pozitivan i u drugoj. RONSSE i sur. (2004). prate 27 uzgojnih kuja tijekom svih faza reproduktivnog ciklusa. Oni opisuju pojavu serokonverzije kod svih seronegativnih kuja. Također opisuju da je 40% serološki pozitivnih kuja u jednoj ili dvije faze spolnog ciklusa dalo negativne rezultate prilikom serološke pretrage uzorka seruma.

RONSSE i sur. (2005.) ističu potrebu ponovnog serološkog ispitivanja, osobito kod korištenja ELISA metode koja ima visoku osjetljivost, s obzirom na činjenicu da jedno testiranje ne daje uvijek točan podatak o serološkom statusu životinje. Također, ističu da je potrebno uzorkovati nekoliko pasa u isto vrijeme ili istog psa uzastopno da bi se dokazala prisutnost CaHV-1 u uzgajivačnici. Ranija istraživanja (RIJSEWIK i sur., 1999.) pokazuju isti serološki rezultat parnih seruma pasa prije uvođenja u uzgajivačnicu i nakon dva do tri tjedna te navode da boravak u uzgajivačnici ne utječe na seropozitivnost.

U ovom istraživanju, od ukupno 136 kuja, sakupljeno je 184 seruma. U 44 kuje koje su uzorkovane u više faza ciklusa, serokonverzija i/ili promijena serološkog statusa zabiježena je kod 11 kuja. Od ukupnog broja mužjaka (67) mužjaka, ponovljeno je 15 seruma i promjena serološkog statusa se javlja u tri mužjaka.

Zajedno sa sedam kuja i tri mužjaka s prisutnom serokonverzijom, i četiri kuje sa promijenjenim serološkim statusom, od ukupnih 203 psa koji su sudjelovali u istraživanju, više puta je ispitano 76 psa (37,44% pasa). Od navedenog broja, 18,42% ponovno ispitanih pasa je promijenilo serološki status.

U skupini kuja, kod sedam kuja zabilježena je serokonverzija. Šest seronegativnih kuja u slijedećem uzorkovanju su bile seropozitivne, a kod tri kuje, nakon jednog negativnog rezultata, slijedila su dva pozitivna. Kod sedme kuje, nakon dva negativna rezultata slijedio je pozitivan rezultat.

Također, četiri kuje pokazale su velike razlike u serološkom statusu. Razlikujemo seronegativnu kuju kod koje u slijedećim testiranjima utvrđujemo dva pozitivna, te na kraju jedan negativan rezultat. Također, u istraživanju sudjeluje seropozitivna kuja, kojoj slijedi negativni serološki rezultat. Prisutna je i seropozitivna kuja s negativnim i ponovno sa

pozitivnim rezultatom, i na kraju, kuja sa negativnim, pozitivnim i završno s negativnim rezultatom.

U skupini mužjaka, kod tri psa zabilježena je serokonverzija. Kod prvog mužjaka negativan rezultat slijedi dva pozitivna, kod drugog mužjaka negativan rezultat slijedi pozitivan. Na kraju, kod trećeg mužjaka, nakon što negativan rezultat slijedi pozitivan, nastavljaju se dva negativna rezultata.

Ako se uzme u obzir da se protutijela za CaHV-1 u serumu mogu dokazati u prosjeku osam mjeseci (LEDBETTER i sur., 2009.) nakon infekcije ili reaktivacije latentne infekcije, ne začuđuje negativan nalaz prilikom ponovnog uzorkovanja. Međutim u dvije kuje došlo je do promjene serološkog statusa u relativno kratkom vremenu. U prvom slučaju kuja je u proestrusu imala titar 1:32 a četiri mjeseca nakon toga, u anestrusu, bila je negativna. U drugom slučaju kuja je pedeseti dan gravidnosti imala titar 1:8 a dva dana nakon poroda bila je negativna. Oba ova slučaja zorno prikazuju osnovnu problematiku serološke dijagnostike infekcije CaHV-1 i potrebu za uzastopnim uzorkovanjem u negativnih životinja, kako je to već ranije naglašeno.

Poseban naglasak ovo istraživanje daje istraživanju utjecaja i značajnosti pojedinih čimbenika rizika koji bi mogli utjecati na izloženost pasa CaHV-1 u skupno držanih uzgojnih životinja. U dostupnoj literaturi postoje ograničeni podaci o utjecaju i značaju pojedinih epizootioloških čimbenika i rezultati su vrlo često kontradiktorni. U ovom radu praćeni su slijedeći čimbenici rizika**:** veličina uzgajivačnice, odlazak na izložbe, sudjelovanje u lovu, provođenje dnevne dezinfekcije, utjecaj spola, dobi, pasmine, uzgajivačnice i broja parenja. Kod kuja je praćen i utjecaj faze spolnog ciklusa, gravidnosti i laktacije na prisutnost protutijela za CaHV-1 te vrijednost titra protutijela. Kako su protutijela za CaHV-1 kratko prisutna u serumu pasa brojni autori su koristili visinu titra protutijela kao parametar koji ukazuje na nedavnu izloženost uzročniku ili reaktivaciju latentne infekcije (RONSSE i sur. 2002., RONSSE i sur. 2004., RONSSE i sur. 2005., DAHLBOM i sur. 2009., KROGENÆS i sur., 2012., LARA i sur. 2016.a.). Kako općenito visina titra prvenstveno ovisi o imunosnom odzivu organizma, virulenciji virusa i dužini trajanja infekcije, konačni zaključci ovog istraživanja nisu doneseni samo na osnovu utjecaja pojedinog čimbenika rizika na vrijednost titra iako su to ranije spomenuti autori radili.

Statističkom analizom i modeliranjem također je ispitana međusobna ovisnost pojedinih čimbenika i njihov utjecaj u cijelini.

Statistički, spol nema značajan utjecaj (p=0,72) na seropozitivnost niti na visinu titra protutijela (p=0,5). Ovo je potpuno u suglasju s rezultatima drugih autora, koji ne nalaze spol kao značajan čimbenik rizika (RONSSE i sur., 2002.; RONSSE i sur., 2004.).

U ovom istraživanju pokriven je širok raspon dobi. Prosječna dob pasa u trenutku uzorkovanja bila je tri godine (raspon od četiri mjeseca do 13 godina). Dob, u ovom istraživanju, nije utjecala na izloženost pasa CaHV-1 (p=0,2) te ne utječe niti na visinu titra protutijela (p=0,28). RONSSE i sur. (2004.) opisuju da dob u kuja ima utjecaj na titar, odnosno da razina titra protutijela raste u pubertetskoj dobi i tokom prve dvije godine života. Ne nalaze seropozitivne jedinke mlađe od 6 mjeseci, što povezuju s kratkim vremenom u kojem je bilo moguće izlaganje virusu te s hormonskim utjecajem koji povećava mogućnost herpesvirusne infekcije ili reaktivacije i tvorbe protutijela tijekom puberteta. Slično i VAN GUCHT i sur. (2001.) ne nalaze seropozitivne pse mlađe od šest mjeseci, a SEO i sur. (1994.) navode progresivan rast titra od puberteta do dobi od dvije odnosno šest godina. Po drugoj strani READING i FIELD, (1998.) ne nalaze povezanost između vrijednosti titra protutijela i dobi. Sukladno ovim podacima, načinjena je dodatna statistička analiza o izloženosti pasa CaHV-1 mlađih (mlađih od dvije godine) i starijih pasa (dob od dvije godine i starijih). U ovom slučaju, također ne dobivamo značajan utjecaj dobi na seropozitivnost jedinke (p=0,08), niti značajni utjecaj dobi na visinu titra protutijela kod pasa starih do dvije godine i starijih od dvije godine (p=0,91).

U uzgojima pasa veliki broj jedinki intenzivno je vođen na izložbe, smotre i ocijenjivanja do dvije godine starosti. Nakon te dobi psi ulaze u uzgoj i rijeđe dolaze u izravni kontakt s većim brojem jedinki koje nisu iz istog uzgoja ali dolaze u direktan kontakt prilikom parenja. Također, iznad dvije godine starosti psi intenzivno počinju sudjelovati u lovu, te na taj način ponovno dolaze u kontakt s većim brojem jedinki koje nisu iz istog uzgoja. Sve navedeno može objasniti sličnu izloženost u životinja različitih dobnih skupina.

Kada se gledao utjecaj pasmine, prvotno se činilo da pasmina značajno utječe na seropozitivnost (p=0,001) kao i da postoji tendencija kod visine titra protutijela (p=0,08). Međutim kada se napravila usporedba uzgajivačnica labrador retrievera (kao najčešće pasmine u istraživanju, 17 uzgajivačnica) pripadnost pojedinoj uzgajivačnici je statistički značajna (p<0,001) za seropozitivnost jedinke, a ne pasmina. Kako se u uzgajivačnicama uobičajeno drži samo jedna pasmina pasa ne čudi ovakav rezultat, gdje je pripadnost pojedinom uzgoju čimbenik rizika, a pasmina je samo vezana varijabla. Utjecaj uzgajivačnice kao čimbenika rizika bi u suštini obuhvaćao više čimbenika koji djeluju istodobno kao što su

veličina, odlazak na izložbe, vrsta dezinfekcije, korištenje u lovu, ali i čimbenike kao što su način parenja, hranidba, nadzor životinja itd.

Veličina uzgajivačnice se pokazala kao izrazito važan čimbenik rizika ($p<0,01$) za izloženost CaHV-1. U ovom istraživanju uzgajivačnice su podijeljene po veličini na male (do devet pasa) i velike (deset i više pasa). Psi koji žive u velikim uzgajivačnicama imaju 6,76 puta veću mogućnost da budu serološki pozitivni od pasa koji žive u malim uzgajivačnicama. Veličina uzgajivačnica osobito je važna u kuja jer kuje koje žive u velikim uzgajivačnicama su 8,47 češće serološki pozitivne ($p<0,01$). Po drugoj strani kod mužjaka veličina uzgajivačnice nema značaj za izloženost CaHV-1 ($p=0,21$). Razlika između spolova vrlo se lako može objasniti drugačijim načinom držanja mužjaka, u manjim skupinama, i po pravilu odvojenih od kuja. Veličinu uzgajivačnice kao važan čimbenik rizika navode i RONSSE i sur., (2004.), zbog veće mogućnosti horizontalnog prijenosa virusa izravnim dodirom. Za razliku od dobivenih rezultata u ovom istraživanju, navedeno istraživanje nalazi da je veličina uzgajivačnice značajan čimbenik rizika i u muških životinja, međutim nalaze da su muške životinje češće seropozitivne u uzgajivačnicama od preko 20 životinja, a takve su bile samo dvije u ovom istraživanju te izdvojena statistička obrada rezultata za ovakve uzgoje nije bila moguća.

Zanimljiv je podatak da veličina uzgajivačnice nema utjecaja na visinu titra protutijela za CaHV-1 ($p=0,74$). Ovo važi i za kuje ($p=0,74$), dok za mužjake nije bilo dovoljno podataka za izračun. Navedeno je u suprotnosti s rezultatima istraživanja RONSSE i sur. (2004.), RONSSE i sur. (2005.) te DAHLBOM i sur. (2009.). RONSSE i sur. (2004.) opisuju da u kuja veličina uzgajivačnice ima utjecaj na visinu titra protutijela. RONSSE i sur. (2005.) bilježe značajno viši titar protutijela u svim fazama ciklusa u kuja koje žive u uzgajivačnicama s više od 20 pasa, u usporedbi sa visinom titra protutijela kod kuja koje žive u uzgajivačnicama do šest pasa i u uzgajivačnicama od šest do 20 pasa. DAHLBOM i sur. (2009.) također opisuju viši titar protutijela kod pasa iz velikih uzgajivačnica. Ova razlika u dobivenim rezultatima može biti posljedica različitog načina vođenja uzgajivačnica ovisno o zemlji u kojoj se istraživanje provodi, ali i međusobnoj interakciji više čimbenika rizika koji stoga mogu prekrivati utjecaj jedan drugog. Nažalost zbog ograničenog broja uzoraka nije bilo moguće ispitati međuovisnost utjecaja različitih čimbenika rizika na visinu titra protutijela.

Slijedeći ispitivani čimbenik rizika bio je prisustvovanje izložbama. Statistička anliza pokazala je da su psi iz uzgajivačnica u kojima pojedine životinje učestvuju na izložbama 6,21 puta češće seropozitivni ($p<0,0001$) i to kuje imaju 8,47 puta ($p<0,01$), a mužjaci 7,2

puta veću mogućnost (p=0,01) seropozitivnog nalaza. Ovi su rezultati sukladni rezultatima istraživanja KROGENÆS i sur., 2014. međutim RONSSE i sur., 2004. ne nalaze da je sudjelovanje na izložbama značajan čimbenik rizika. S obzirom na visinu titra protutijela, psi iz uzgajivačnica u kojima životinje sudjeluju na izložbama nemaju više vrijednosti titra od onih kod kojih to nije slučaj (p=0,52). Sudjelovanje na izložbama ne utječe na visinu titra niti u kuja (p=0,54) niti u mužjaka (p=0,85). Značaj izložbi kao čimbenika rizika nije teško objasniti ako se zna da je najznačajniji način širenja infekcije u populaciji pasa oronazalnim putem (RONSSE i sur., 2002.; RONSSE i sur., 2004.; KROGENÆS i sur., 2012.). Sudjelovanje na izložbama omogućuje bliski kontakt velikog broja pasa porijeklom iz različitih uzgajivačnica. Ako se ovome pridoda i utjecaj stresa (nepoznat ambijent, gužva i prijevoz) koji može dovesti do aktivacije latentne infekcije razumljiv je utjecaj ovog čimbenika na seropozitivnost jedinke.

Kako bi se isključila mogućnost međusobnog prekrivanja utjecaja pojedinih čimbenika, napravljene su dodatne statističke analize. S obzirom da je prethodnom analizom ustanovljeno da je prisustovovanje izložbama imalo značaj utjecaj na seropozitivnost pasa (p<0,001), ovaj čimbenik rizika je dodatno istražen.

U skupini pasa u kojoj svi psi idu na izložbe, ispitan je utjecaj veličine uzgajivačnice na seropozitivnost. Statističkom analizom dobivamo podatak da izložbeni psi koji potječu iz velikih uzgajivačnica (10 i više pasa) su 19,96 puta češće seropozitivni nego psi koji idu na izložbe, a potječu iz manjih (manje od 10 pasa) uzgajivačnica. Veličina uzgajivačnice značajno (p=0,04) utječe na broj seropozitivnih izložbenih pasa (kod kuja ima tendenciju da bi mogla biti značajna, p=0,06; kod mužjaka nema značajnost (p=0,26)), te je veličina uzgajivačnice i unutar skupine izložbenih pasa važan čimbenik rizika koji značajno utječe na seropozitivnost jedinke.

Treći istraživani čimbenik rizika je sudjelovanje pasa u lovu. Sudjelovanje u lovu ima značajan utjecaj na broj seropozitivnih pasa u uzgoju (p<0,001), odnosno postoji 5,99 posto veća mogućnost seropozitivnog nalaza kod pasa koji idu u lov. Lov kao čimbenik rizika utječe na broj seropozitivnih životinja ovisno o spolu (kuje p=0,03, OR= 3,72, mužjaci p<0,01, OR=19,29). S druge strane, lov ima i značajan (p<0,01) utjecaj na visinu titra protutijela. KROGENÆS i sur. (2012.), su u svom istraživanju pokazali da sudjelovanje u lovu nema utjecaja na izloženost pasa CaHV-1 niti na visinu titra protutijela. Uzimajući u obzir oba ova podatka, o utjecaju lova na izloženost i visinu titra, u ovom radu, najvjerojatnijim se čini objašnjenje da je lov značajno mjesto gdje se psi zaražavaju, a fizički napor i stres dovode i do reaktivacije latentnih infekcija što bi odgovaralo porastu titra u već

inficiranih životinja. Odlazak u lov nema značajan utjecaj (p=0,09) na seropozitivnost izložbenih pasa (niti u skupini kuja (p=0,59) i mužjaka (p=0,05), ali ima na visinu titra protutijela (p=0,01) i to kuja (p<0,01), ali ne i kod mužjaka (p=0,63)) ponovno otvarajući pitanje o različitom načinu držanja muških i ženskih životinja u uzgoju, zbog činjenice da se virus horizontalno širi među skupno držanim ženskim životinjama.

Kako sudjelovanje pasa u lovu ima značajni utjecaj na seropozitivnost pasa, ispitan je utjecaj odlazaka na izložbe u skupini pasa u kojoj psi ne odlaze u lov.

Nakon isključivanja lova kao mogućeg čimbenika rizika, dobivamo podatak da odlazak na izložbe i dalje ima značajni utjecaj na seropozitivnost pasa, odnosno kod pasa čija namjena je isključivo izložbena postoji 8,91 puta veća mogućnost da budu seropozitivni (p<0,0001); 8,67 puta veća mogućnost da budu seropozitivni (p<0,001) kod kuja i 10,83 puta veća mogućnost da budu seropozitivni (p=0,03) kod mužjaka. Na visinu titra protutijela nema značajan utjecaj kod svih pasa (p=0,47) i kuja (p=54), a kod mužjaka nije bilo dovoljno podataka za izračun.

Također, unutar skupine izložbenih pasa kada uspoređujemo seropozitivnost jedinki s obzirom na činjenicu da li sudjeluju ili ne u lovu, dobivamo podatak da na broj seropozitivnih izložbenih pasa odlazak u lov ima tendenciju da bi mogao imati utjecaj (p=0,09). Na broj seropozitivnih izložbenih kuja lov ne utječe (p=0,59) a na broj seropozitivnih mužjaka ima tendenciju da bi mogao imati utjecaj (p=0,05). Ovo se može objasniti izrazito jakim utjecajem odlaska na izložbe koji je vjerojatno osnovni čimbenik koji utječe na serološki status psa. Po drugoj strani lov utječe na visinu titra kod izložbenih pasa i ima značajan utjecaj (p=0,01), kod kuja (p<0,01) ali ne i kod mužjaka (p=0,63) te ova dva čimbenika djeluju sinergistički na unos infekcije u uzgoj i reaktivaciju latentnih infekcija.

RONSSE i sur. (2004.) navode da se viša seroprevalencija očekuje u velikim uzgajivačnicama, pogotovo u lošim higijenskim uvijetima. Također navode da u malim uzgajivačnicama (do šest pasa) na titar protutijela ne utječe higijena, dok u velikim uzgajivačnicama značajno je viši titar u onima s nedovoljnom razinom higijene. Isti autori navode da loši higijenski uvjeti i prenapučenost utječu na visinu titra u kuja dok ne utječu na razinu titra u mužjaka. To se objašnjava s činjenicom da su kuje generalno u uzgajivačnicama u većem broju i držane zajedno, a mužjaci su u manjem broju i često se drže odvojeno, što govori u prilog značaja oronazalnog prijenosa infekcije. I u ovom istraživanju dobivamo podatke da učestalost provođenja dezinfekcije, odnosno svakodnevna dezinfekcija, značajno umanjuje broj seropozitivnih jedinki (p<0,001, OR=6,81) ali značajno ne utječe na visinu titra

protutijela (p=0,22). Ovakav statistički rezultat nije neočekivan zbog osjetljivosti CaHV-1 na uobičajene dezinficijense i u boljim higijenskim uvijetima postoji manja mogućnost kontakta s virusom. Potpuno isto kao u prethodnom istraživanju i u ovom istraživanju kod mužjaka dezinfekcija značajno utječe na seropozitivnost (p=0,03, OR=10,), ali nema značajnog utjecaja na razinu protutijela (p=0,2) što se može objasniti, kako je već ranije navedeno, razlikama u držanju muških i ženskih životinja, te primarnim horizontalnim širenjem infekcije u uzgojima. Kod ženki dezinfekcija također ima značajan utjecaj na seroprevalenciju (p<0,01, OR=5,87) ali nema značajan utjecaj na razinu titra protutijela (p=0,23). Ovo je u suprotnosti s rezultatima prethodnog istraživanja. Ženke se drže u većim skupinama i vrlo lako je moguće da se infekcija širi izravnim kontaktom tijekom socijalnog ponašanja, a da su kontaminirani predmeti i nastambe više bitni za reinfekcije i stvaranje protutijela koje slijedi kod reinfekcija. Nažalost zbog ograničenog broja životinja koje su bile dostupne za uzorkovanje nije bilo moguće ispitati međusobni utjecaj dezinfekcije i drugih čimbenika rizika.

Parenje u kuja je također značajan čimbenik rizika (p<0,01), u skupini parenih kuja ima značajno veći broj seropozitivnih jedinki. Navedeno potvrđuje podjela kuja u tri skupine (nikada parene kuje, jednom parene kuje i kuje s više parenja), gdje također i broj parenja kuja značajno utječe na broj seropozitivnih jedinki (p=0,04). Navedeni rezultati su objašnjivi s većim kontaktom kuja i mužjaka u onih s većim brojem parenja.

Kada se uzme u obzir faza spolnog ciklusa kuje u kojem je načinjeno uzorkovanje seruma, dobivamo podatak da pojedina faza spolnog cikusa nema značajnog utjecaja (p=0,24) na broj seropozitivnih kuja kao ni na visinu titra protutijela (p=0,24). Statistički značajne razlike nema ni u odnosu broja serološki pozitivnih kuja pojedine faze spolnog ciklusa u odnosu na ostale fazame spolnog ciklusa. Navedeno ukazuje na činjenicu da ako nema razlike u seropozitivnosti, sa dijagnostičkog gledišta, nema ni pojedine faze spolnog ciklusa u kojoj bi češće dobili seropozitivan rezultat i lakše utvrdili predhodni kontakt kuje s CaHV-1.

Ovakav dobiveni podatak je suprotan od objavljenih podataka u literaturi. RONSSE i sur. (2005.) opisuju smanjenje razine titra protutijela tokom ranog i kasnog diestrusa. Smatraju da bi diestrus mogao biti kritičan period povezan s niskom imunosti na CaHV-1. Kod kuja s niskim titrom protutijela u ranom ili kasnom diestrusu prisutna je neplodnost odnosno reproduktivni poremećaji (resorpcija ploda ili mumifikacija), kao i u kuja s visokim titrom protutijela, ali tada reprodukivni poremećaji nisu vezani uz CaHV-1.

Gravidnost i laktacija značajno ne utječe na seroprevalenciju u kuja kao ni na srednju vrijednost visine titra protutijela (p>0,05). Ovaj rezultat dobiven je usporedbom

seropozitivnosti i visine titra protutijela kuja koje su podjeljene u skupine ovisno o prisutnoj gravidnosti tokom diestrusa i posljedično prisutnoj laktaciji u anestrusu. Dakle, napravljena je usporedba seropozitivnosti i srednje vrijednosti titra protutijela u kuja u diestrusu sa i bez gravidnosti (p=0,07; p=0,45) u anestrusu sa i bez laktacije (p=0,93; p=0,24), usporedba gravidnih kuja i svih ostalih kuja u istraživanju koje u trenutku uzorkovanja nisu bile gravidne (p=0,97; p=0,36) kao i kod kuja u laktaciji i svih svih ostalih kuja u istraživanju koje u trenutku uzorkovanja nisu u laktaciji (p=0,77; p=0,34). I na kraju, napravljena je usporedba seropozitivnosti i srednje vrijednosti titra protutijela ukupnog broja kuja koje su u trenutku uzorkovanja bile gravidne i u laktaciji sa svim ostalim kujama u istraživanju izvan gravidnosti i laktacije (p=0,89; p=0,72). Navedenim usporedbama dokazali smo da gravidnost i laktacija, bez obzira na povećani stres i metabolizam jedinke, ne utječe na visinu titra protutijela. Dobiveni rezultat je logičan jer su gravidne kuje i kuje u laktaciji (i imaju štenad) uvijek držane izolirane od ostalih kuja i mužjaka pa je i mogućnost kontakta sa virusom i horizontalnog prijenosa svedena na minimum. Osim izoliranog držanja, kod navedenih kuja izrazito je pojačan režim dezinfekcije, a kuja zajedno sa štenadi je konstantno grijana što sve može imati utjecaj na nalaz. Možemo zaključiti da su gravidnost, porođaj i laktacija fiziološki procesi koji ne predisponiraju kuju za infekciju ili reaktivaciju latentne infekcije CaHV-1.

Osim zasebne analize svakog pojedinog čimbenika rizika, napravljeni su i modeli – logistička regresija u slučaju analize utjecaja čimbenika na seroprevalenciju. Na ovaj način se mogla neposredno odrediti međusobna ovisnost različitih čimbenika rizika i isključiti one koji međusobno visoko koreliraju, kako je to prikazano prilikom ispitivanja utjecaja pasmine kao čimbenika rizika. Osnovno ograničenje ove statističke metode je broj podataka dostupnih u istraživanju.

Logističkom regresijom uspoređena je značajnost utjecaja tri čimbenika rizika na seroprevalenciju: veličine uzgajivačnice, sudjelovanja na izložbama i u lovu u ukupnom broju pasa (R^2=0,25). Navedenom analizom pronađena je značajnost za veličinu uzgajivačnice (p<0,01) i za sudjelovanje na izložbama (p<0,01) te za sudjelovanje u lovu (p=0,03). Dobiveni rezultat je u suglasju sa statističkom analizom svakog pojedinog od navedenih čimbenika gdje su i veličina uzgajivačnice (p<0,01) i sudjelovanje na izložbama (p<0,001) i sudjelovanje u lovu (p<0,001) imale značajan utjecaj na broj serološki pozitivnih pasa u uzgoju.

U skupini kuja, uspoređena je značajnost tri čimbenika rizika na seroprevalenciju: veličine uzgajivačnice, sudjelovanja na izložbama i u lovu (R^2=0,23). Od tri navedena čimbenika rizika, dobivamo značajnost za veličinu uzgajivačnice (p<0,01) i lov (p<0,05), dok

za sudjelovanje na izložbama ne dobivamo značajnost (p=0,1). U statističkoj analizi pojedinih čimbenika, suglasje sa dobivenim podacima je u značajnosti s veličinom uzgajivačnice (p<0,01) i s sudjelovanjem u lovu (p<0,001), a nije u suglasju sa značajnosti sudjelovanja na izložbama (p<0,01).

Logističkom regresijom, u skupini mužjaka, uspoređena je značajnost dva čimbenika rizika na seroprevalenciju: broj parenja i sudjelovanje u lovu (R^2=0,24). Broj parenja ima značajan utjecaj na serološki status mužjaka, kao i sudjelovanje u lovu (p<0,01).

U ovom radu pod reproduktivnim poremećajima podrazumjevala se sva simptomatologija koja bi se na neki način mogla dovesti u vezu s infekcijom CaHV-1: uginuća štenadi, mali broj štenadi u leglu, pojava patološki promjenjenih plodova i nemogućnost koncepcije kuja. Nemogućnost koncepcije u kuja uvrštena je u reproduktivne poremećaje koji su predmet interesa ovog istraživanja iz razloga što se kod gravidnih kuja može razviti sistemska infekcija CaHV-1 koja rezultira embrionalnom resorpcijom, fetalnom smrću, pobačajem s ili bez mumifikacije, s prerano oštenjenim ili mrtvooštenjenom štenadi (HASHIMOTO i sur., 1983., HASHIMOTO i sur., 1982., POSTE i KING, 1971.).

DAHLBOM i sur. (2009.) opisuju 100% seroprevalenciju u pasa iz uzgajivačnica s reproduktivnim problemima i 65% seroprevalenciju kod pasa iz uzgajivačnica bez reproduktivnih problema. VAN GUCHT i sur. (2001.) nalaze povezanost seroprevalencije u kuja s nedavnim gubitkom legla i s problemima u plodnosti.

RONSSE i sur. (2005.) ne nalaze značajnu razliku u visini titra u kuja s i bez reproduktivnih problema, a DAHLBOM i sur. (2009.) i RONSSE i sur. (2004.) opisuju značajno viši titar u uzgajivačnicama s reproduktivnim problemima.

U ovom istraživanju nije nađena povezanica anamnestičkih podataka vezanih za pojavu reproduktivnih poremećaja sa serološkim statusom kuje (p=0,83). Također, kada se određeni reproduktivni problemi podjele u skupine (uginuće štenadi, mali broj štenadi, patološki promjenjeni plodovi, kuje koje ne koncipiraju – mogućnost ranog pobačaja) ne nalazimo statistički značajnu razliku (p=0,27) između serološki pozitivnih i negativnih kuja. Utjecaj visine titra protutjela na pojavu reproduktivnih problema nije testiran zbog nedovoljnog broja serološki pozitivnih uzoraka.

Statistički, nema značajne razlike u načinu okota kuje (odnosno je li kuja imala prirodan okot ili se pristupilo carskom rezu zbog distocije) s obzirom na seropozitivnost (p=0,87), niti između ukupnog broja štenadi seropozitivnih i seronegativnih kuja (p=0,28). Također, nema značajne razlike između broja žive štenadi u odnosu na broj seropozitivnih i seronegativnih kuja (p=0,6).

Broj uginule štenadi kod seropozitivnih kuja značajno je manji ($p<0,01$) nego kod seronegativnih kuja. Kuje koje su tijekom gravidnosti seropozitivne (imaju dovoljan titar zaštitnih protutijela) svojim protutijelima štite i zametak i kasnije plod od moguće infekcije, što rezultira i manjim brojem uginule štenadi na okotu. U literaturi se navodi da novorođena štenad od antigeno negativne kuje izložena CaHV-1 razvija akutnu, sistemsku infekciju (ANVIK, 1991., DECARO i sur., 2008.). Štenad od antigeno pozitivne kuje je zaštićena od infekcije putem majčinih protutijela koja primaju putem placente tijekom gravidnosti i putem kujina mlijeka (RONSSE i sur., 2004.).

S druge strane, točan mehanizam patogeneze reaktivacije virusa tijekom gravidnosti je i dalje nepoznat. S obzirom na činjenicu latencije u lumbosakralnom gangliju, moguće je da se maternična infekcija nakon reaktivacije virusa javlja bez viremije (BURR i sur., 1996., MIYOSHI i sur., 1999.).

Ovdje je vidljiva važnost da kuja u gravidnosti bude seropozitivna, odnosno da ima zaštitini titar protutijela. Ako je kuja seronegativna, zaštitini titar protutijela može razviti putem cijepljenja slijedeći protokol - prvom dozom za vrijeme proestrusa ili estrusa i revakcinacijom 50. dan gravidnosti, kako bi se omogućila dovoljna visina titra protutijela. U Republici Hrvatskoj koristi se subjedinična vakcina, koja po dozi od 1 ml sadrži antigeni herpes virusa pasa (soj F205) i 0,3 do 1,75 μg glikoproteina ovojnice (gB glikoprotein) CaHV-1. Upotreba cjepiva protiv CaHV-1 je diskutabilna kod kuja koje su seropozitivne i već imaju visok titar protutijela.

Kao dodatni dio ove doktorske disertacije praćena je uspješnost cijepljenja 40 kuja protiv CaHV-1. Od ukupnog broja cijepljenih kuja čak 52,5% nije serokonvertiralo. Četiri kuje su ponovno testirane i rezultati drugog uzorka cijepljenih kuja je bio jednak prvom rezultatu (dvije seropozitivne kuje su ostale seropozitivne, te dvije seronegativne su ostale seronegativne). Kada su vlasnici životinja pitani o načinu i mjestu cijepljenja ustanovljeno je da određeni broj životinja cijepe sami uzgajivači. Zbog navedenog, podijelili smo kuje u skupine s obzirom na mjesto cijepljenja (u veterinarskoj ambulanti ili u uzgajivačnici). Na ovaj način želio se izbjeći utjecaj transporta i nestručnog rukovanja s cijepivom u terenskim uvjetima.

Kod kuja koje su cijepljene u veterinarskim organizacijama ustanovljena je značajno ($p<0,01$) veća serokonverzija u usporedbi sa kujama cijepljenjim izvan ambulante. Također, broj cijepljenja ne utječe na visinu titra protutijela (r_s=-0,21; p=0,34). U skupini kuja cijepljenih u ambulanti postoji umjerena korelacija između vremena koje je proteklo od zadnjeg cijepljenja i visine titra protutijela (r_s = -0,55; p=0,02), odnosno što je više vremena

proteklo od zadnjeg cijepljenja, razina protutijela je niža. Nije nađena korelacija između broja cijepljenja i visine titra protutijela u kuja (r_s = 0,12; p=0,56).

Iz navedenih primjera se ponovno vidi potreba za provođenjem dijagnostike CaHV-1 prije provođenja zaštitnog cijepljenja – ako kuja ima zaštitni titar nije potrebno cijepiti u testiranom ciklusu. Zaključno, uputno je cijepiti kuje u veterinarskoj ambulanti kako bi cjepljenje bilo uspješno.

I na kraju, poznavajući seropozitivnost kuja pokušali smo dobiti bolji uvid u fiziologiju okota. Praćen je utjecaj seropozitivnosti na brzinu pada serumskog progestreona posljednjih 48 i 24 sata pred okot i na dan okota kao te posljedični pad rektalne tempearture.

Kod korištenja vrijednosti serumskog progesterona prilikom procjene početka okota, odnosno moguće distocije, potrebno je koristiti kvantitativna mjerenja, uzimati uzorak uvijek u isto vrijeme (zbog mogućnosti dnevnih fluktuacija te posljedično krivog tumačenja nalaza) i obraditi ga na pravilan način (krv mora biti vađena u običnu epruvetu bez aktivatora grušanja ili gela za odvajanje seruma, pohranjena na +4 ºC, a serum mora biti odvojen unutar 12 sati) (KUTZLER i sur., 2003.a, KUTZLER i sur., 2003.b, BRUGGER i sur., 2011.).

Zbog različitih navoda u literaturi, bilo bi poželjno da svaki uzgajivač unutar svog uzgoja radi svoju temperaturnu krivulju i brzinu pada progesterona.

U prijašnjim istraživanjima zabilježeno je da brzina pada progesterona pred okot ovisi i o starosti kuje, odnosno u kojoj dobi prvi puta ima okot (GRACIN i sur., 2017.). Također, zabilježeno je da mjerenjem rektale tempearture četiri puta dnevno s usporednim padom progesterona, moguće je posumnjati na distociju (GRACIN i LOJKIĆ, 2016.).

I drugi autori navode da bi temperatura trebala biti mjerena svakih 8 sati da se zabilježi pad, nakon kojeg se vraća na normalne vrijednosti, a prvi stadij okota počinje 12–36 sati nakon pada progesterona ispod 2 ng/ml (LOPATE, 2012.).

LINDE FORSBERG (2015.) navodi da nagli pad tjelesne temperature moguće bilježiti 8 do 24 sata prije okota, što je 10 do 14 sati nakon što koncentracija progesterona u perifernoj plazmi padne ispod 2 ng/ml. U svrhu što točnije procjene predporođajnog pada tjelesne temperature, navodi da bi mjerenja trebala biti rađena svakih 1 do 2 sata, odnosno dovoljno često da se zabilježi trenutak ponovnog porasta, a provode se sve dok traje navedeni pad.

U ovom istraživanju, u praćenju vrijednosti rektalne temperature primjetno je kako o serološkom statusa kuje ne ovisi broj sati pred okot kada je zabilježen pad rektalne temperature (p=0,57), razlika između prosječne i najniže rektalne temperature (p=0,27) i razlika između vrijednosti izmjerene najniže rektalne temperature (p=0,93).

Jednaku razliku u padu rektalne temperature bi trebao pratiti i pad vrijednosti serumskog progesterona. Razina serumskog progesterona je statistički značajno viša ($p<0,001$) jedino kod seropozitivnih kuja dva dana pred okot ali razlika jedan dan ($p=0,19$) i na dan okota ($p=0,50$) više nije značajna.

Stoga možemo zaključiti kako ni pad razine serumskog progesterona i rektalne temperture nije značajno povezano sa serološkim statusom kuje te se ne može koristiti u procjeni tijeka zadnjeg dijela gravidnosti i početka okota.

Prema planu istraživanja, u praćenju zadnjeg perioda gravidnosti, osim bilježenja pada vrijednosti serumskog progesterona i tjelesne temperature kuje, pristupilo se i fetometrijskom mjerenju plodova. Navedena mjerenja obavljana su i prilikom dijagnostike gravidnosti. Dobivena mjerenja uvrštena su u Luvoni-Grioni formulu za predviđanje dana okota kuje.

Prilikom dijagnostike gravidnosti mjeren je unutarnji promjer korionske šupljine (ICC) u razdoblju od 32 do 18 dana do okota kuje (četiri i pet tjedana do okota kuje, ukupno 22 mjerenja). U navedenom razdoblju dobivena je niža točnost predviđanja u usporedbi s podacima iz literature (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.).

U ovom istraživanju, kada se uzima u obzir točnost fetometrijskih mjerenja ICC samo u periodu 32 do 25 dana (četiri tjedna do okota kuje, 11 mjerenja) dobivamo veću točnost predviđanja dana okota. U literaturi se navodi da točnost ovisi o broju plodova, odnosno, manji ili veći broj plodova od uobičajenog za pojedinu pasminu može utjecati na točnost mjerenja (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.).

Prilikom procjene vitalnosti plodova u kasnoj fazi gravidnosti mjeren je razmak između dvije tjemene kosti (BPD, ukupno načinjeno 65 mjerenja) u rasponu od osam dana do dana okota te mjerenja klasificirali u dvije skupine. U slučaju podataka dobivenih mjerenjem BPD u rasponu od osam dana do tri dana do okota, dobiva se veća točost u usporedbi sa mjerenjima BPD zadnja dva dana do okota, kada se dobiva se izrazito niska točnost.

Prema navedenom, koristeći Luvoni-Grioni formulu za kuje težine 25-30 kg u periodu od osam do tri dana do okota možemo dobiti samo okvirni rezultat u predviđanju broja dana do okota, koji je točniji od mjerenja zadnjih 48 sati pred okot.

I u literaturi se navodi da mjerenja BPD imaju visoku točnost (±1 dan) do kraja šestog tjedna gravidnosti, a zadovoljavajuću točnost (±2 dan) do osmog tjedna. Blizu termina okota (deveti tjedan gravidnosti) mjerenja BPD imaju najnižu točnost predviđanja (BECCAGLIA i LUVONI, 2006.), što je sukladno i našim podacima.

U skupini fetometrijskih mjerenja ICC u razdoblju od 32 do 18 dana do okota (ukupno 22 mjerenja), nakon usporedbe serološkog statusa kuje, ne dobivamo značajnost kod pogreške

od ±1 dan (p=1) i od ±2 dana. Kod pogreške od ±3 dana dobivamo značajnu razliku u korist seropozitivnih kuja (p=0,04), odnosno kod njih dobivamo značajno veću točnost kod mjerenja. Kod fetometrijskih mjerenja ICC manjem rasponu dana (od 32 do 25 dana do okota), niti u jednoj skupini ne dobivamo značajnost (±1 dan (p=1), ±2 dana (p=1) i ±3 dan (p=0,58).

Također, kod mjerenja BPD u ukupnom rasponu od osam dana do dana okota, u okviru točnosti predviđanja okota s greškom od ±1, ±2 i ±3 dana, od ukupnih 65 mjerenja, ne dobivamo značajnu razliku (±1 dan (p=1), ±2 dana (p=0,78) i ±3 dan (p=0,27)). Kada se navedeni raspon dana podijeli u dvije skupine, zbog slabije točnosti mjerenja neposredno pred okot, i dalje ne dobivamo značajnu razliku u točnosti mjerenja s obzrom na seropozitivnost kuje (BPD mjeren u rasponu od osam do tri dana značajnost greške je ±1 dan (p=71), ±2 dana (p=0,73) i ±3 dan (p=0,7) i BPD mjeren u rasponu od dva dana do dana okota ±1 dan (p=0,55), ±2 dana (p=0,11) i ±3 dan (p=0,2). Iz navedenog možemo zaključiti da seropozitivnost ne utječe na razvoj plodova u mjerenim razdobiljima.

Analizom rendgenoloških snimaka nije nađena patologija ploda niti patologija koja bi ukazivala na moguću distociju. Rendgenološka metoda, zbog štetnog utjecaja zračenja na plodove preporuča se u što kasnijoj fazi gravidnosti, ali je i dalje najtočnija metoda za određivanje broja plodova i određivanja položaja zaostalog ploda prilikom otežanog okota. U ovom istraživanju uporabom ove metode nismo dobili podatke o mogućoj distociji, dobiveni su jedino podaci o mogućoj atoniji maternice kod utvrđivanja velikog broja plodova.

Nije pronađena statistički značajna razlika u načinu okota (u usporedbi broja kuja s prirodnim okotom i carskim rezom) s obzirom na broj seropozitivnih jedinki.

Također, kod seropozitivnih kuja, bilježimo 6,33±0,58 žive štenadi i nula mrtve štenadi. Kod seronegativnih kuja, bilježimo 5,31±3,07 žive i 1,85±1,95 mrtve štenadi. Nema značajne razlike između broja žive štenadi i ukupnog broja štenadi s obzirom na serološki status kuje. Jedino je prisutna značajna razlika (p<0,01) između broja uginule štenadi, mada je takav rezultat moguć i zbog malog broja statističkih podataka.

Zaključno, težnja ovog rada bila je dati odgovor na nerazriješena pitanja u dijagnostici te epizootiologiji CaHV-1 infekcije u pasa kako na lokalnoj razini tako i u svjetskim razmjerima. Zasigurno veliki znanstveni doprinos rezultata ovog istraživanja je iznalaženje postupka izvođenja VNT koji je pokazao veću osjetljivost od svih dosada opisanih postupaka. Time su stvoreni preduvjeti da se s daleko većom sigurnošću može odrediti serološki status kako na razini jedinke tako i na razini uzgajivačnice. Kod infekcije CaHV-1 ovo ima vrlo

veliki značaj zbog latentnih kliconoša koji omogućuju uzročniku ove bolesti dugu perzistenciju u određenom uzgoju, te nanošenje znatnih ekonomskih i uzgojnih gubitaka.

Nadalje ovaj rad omogućava veterinarima praktičarima izbor najučinkovitije metode uzorkovanja. Uzorkovanje seruma više životinja ili uzastopno uzorkovanje kuje u više faza spolnog ciklusa, koja će uz najmanje troškove i u najkraćem vremenu omogućiti određivanje serološkog statusa jedinke odnosno uzgajivačnice.

Detaljna statistička analiza pojedinih epizootioloških čimbenika te njihovih međuodnosa, a koji su odgovorni za unošenje i perzistenciju CaHV-1 u uzgajivačnicama pasa, omogućava ciljanu primjenu mjera opće i specifične profilakse na kritičnim točkama te učinkovito praćenje i suzbijanje bolesti. Nedvojbeno, u epizootiologiji infekcije CaHV-1 postoje dva puta kruženja uzročnika u svakom uzgoju: kruženje među kujama i kruženje među rasplodnim mužjacima. Kod kuja osnovni put unošenja CaHV-1 u uzgoj je prilikom sudjelovanja životinja na izložbama, a zatim slijedi horizontalno oronazalno širenje neposrednim kontaktom unutar uzgajivačnice. Horizontalnom širenju pogoduju stresne situacije kao što su sudjelovanje u lovu i držanje kuja u prenapučenim uvjetima. S druge strane, estrus, gravidnost, okot i laktacija nisu kritični periodi u životu kuje koji bi doveli do reaktivacije latentne infekcije i horizontalnog širenja. Mjere opće profilakse kao što je redovito čišćenje i dezinfekcija predmeta i prostora u kojima borave kuje, te smanjivanje stresa koji je posljedica držanja kuja u velikim skupinama relativno su jednostavne mjere koje mogu smanjiti širenje CaHV-1. S druge strane, specifična imunoprofilaksa koja bi se provodila na način da se vrhunac zaštite postigne u vrijeme kada predmetna kuja treba sudjelovati u izložbi pasa je mala izmjena koja može dovesti do značajnih rezultata.

Rasplodni mužjaci najčešće budu inficirani prilikom parenja, a reaktivacija latentne infekcije kao i širenje uzročnika među muškim životinjama posljedica je stresa prilikom lova, ali i stresa i infekcija prilikom slijedećih parenja. Iako je moguća infekcija mužjaka kao posljedica horizontalnog širenja uzročnika u uzgajivačnici, svakodnevno čišćenje i dezinfekcija prostora i predmeta učinkovito ovo spriječava. Kao i kod kuja, specifična imunoprofilaksa mužjaka bi mogla davati optimalnu zaštitu u kritičnom periodu, koja je za mužjake vrijeme parenja. Lov u manjim skupinama pasa smanjuje i mogućnost dolaska u kontakt sa novim sojevima virusa koji lovački psi prilikom lova mogu izlučivati usljed reaktivacije latentne infekcije.

Na kraju, u ovom radu je po prvi puta opisana samo djelomična učinkovitost imunoprofilakse u pobuđivanju humoralne imunosti u cijepljene životinje. Samo 47,5% cijepljenih kuja razvije detektibilan titar protutijela nakon cijepljenja. Vrlo je važan i podatak

da se u osnovi ove pojave krije ustaljena praksa uzgajivača da samostalno cijepe životinje. Iako navedeno može biti veliki problem, ovo istraživanje nudi i rješenje u vidu edukacije vlasnika uzgajivačnica kako bi se prekinula praksa nestručne aplikacije cjepiva. Zanimljiv je i podatak da i kod kuja cijepljenih u veterinarskim orgasnizacijama ne postoji korelacija titra i broja cijepljenja što potvrđuje da je trajanje zaštite nakon cijepljenja kratko te je potrebno rasplodne kuje docijepiti prilikom svakog sljedećeg parenja.

5. ZAKLJUČCI

1. Seroprevalencija CaHV-1 u uzgajivačnicama na području RH je 32,02% određena virus neutralizacijskim testom i 30% određena imunoenzimnim testom, te je infekcija CaHV-1 izrazito proširena zarazna bolest pasa u našoj zemlji.
2. Za utvrđivanje serološkog statusa jedinke ili uzgoja potrebno je višekratno uzorkovanje, odnosno uzorkovnje više životinja iz iste uzgajivačnice.
3. Od svih istraživanih inačica virus neutralizacijskog testa najveća osjetljivost postiže se testiranjem nativnih uzoraka seruma pasa.
4. Specifičnost i osjetljivost komercijalnog dijagnostičkog kompleta za izvođenje imunoenzimnog testa, kao i virus neutralizacijskog testa, nedostatne su za pouzdanu serološku dijagnostiku infekcije CaHV-1 pojedinačnom primjenom.
5. Molekularne metode nisu metode izbora za dokaz prisutnosti i kruženja CaHV-1 u uzgoju.
6. Čimbenici rizika koji imaju najveći neposredni utjecaj na unos i cirkulaciju CaHV-1 u uzgojima pasa su: posjet izložbama, držanje pasa u velikim skupinama i lov.
7. Parenje je kritična točka zaražavanja rasplodnih jedinki i unosa virusa CaHV-1 u uzgoj.
8. Redovito čišćenje i održavanje optimalnih higijenskih uvijeta u uzgajivačnici značajna je mjera opće profilakse koja spriječava horizontalno širenje CaHV-1 u uzgoju.
9. Serološki status kuje ne utječe na pojavu reproduktivnih problema.
10. Imunoprofilaksa ne dovodi do serokonverzije u svih cijepljenih pasa, te je upitna njezina učinkovitost osobito ako cijepljenje provode nestručne osobe.

8. LITERATURA

ALBERT, D. M., M. LAHAV, L. E. CARMICHAEL, D. H. PERCY (1976): Canine herpesvirus induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. Invest. Ophtalmol. 15, 267-278.

ANONIMUS (2002): European Medicines Agency (EMEA). Eurican Herpes 205. Scientific discussion. 2002; 1-16. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/veterinary/000059/WC500066409.pdf

ANTONOV, A. L. (2017): Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. Bulg. J. Vet. Med., 20, 193–203.

ANVIK, J. O. (1991): Clinical considerations of canine herpesvirus infection. Vet. Med. 4, 394-403.

APPEL, M. J., M. MENEGUS, I. M. PARSONSON, L. E. CARMICHAEL (1969): Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups, Am. J. Vet. Res. 30, 2067–2073.

BEAM, A. L., J. E. LOMBARD, C. A. KOPRAL, L. P. GARBER, A. L. WINTER, J. A. HICKS, J. L. SCHLATER (2009): Prevalence of failure of passive transver of immunity in newborn heifer calves and associated management practies on UD dairy operations. J. Dairy Sc. 92, 3973-3980.

BECCAGLIA, M., G. C. LUVONI (2006): Comparison of accuracy of two ultrasonographic measurements in predicting the parturition date in the bitch. J. Small Anim. Pract. 47, 670-673.

BECCAGLIA, M., M. FAUSTINI, G. C. LUVONI (2008): Ultrasonographic study of deep portion of diencephalon – telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus. Reprod. Dom. Anim. 43, 367-370.

BECHER, A., A. WEHREND, S. GOERICKE-PESCH (2010): Luteal insufficiency in the bitch – symptom, diagnosis, consequences and therapy. A review of the literature. Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleinetiere Heimtiere. 38, 389-396.

BOIVIN, G., T. MAZZULLI, M. PETRICK (2009): Diagnosis of viral infections. U: Clinical virology, 3rd ed (Richman, D.D., R.J. Whitley, F.G. Hayden, ur.). ASM Press, Washington, DC. str. 265-294.

BOTTINELLI, M., E. RAMPACCI, V. STEFANETTI, M. L. MARENZONI, A. M. MALMLOV, M. COLETTI, F. PASSAMONTI (2016): Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. J. Vet. Med. Sci. 78, 797–802.

BRUGGER, N., C. OTZDORFF, B. WALTER, B. HOFFMANN, J. BRAUN (2011): Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay. Reprod. Anim. 46, 870–873.

BURR, P. D., M. E. CAMPBELL, L. NICOLSON, D. E. ONIONS (1996): Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 53, 227–237.

BUONAVOGLIA, C:, V: MARTELLA (2007.): Canine respiratory viruses. Vet. Res. 38, 355-373.

CARMICHAEL, L. E., R. A. SQUIRE, L. KROOK (1965): Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. Am. J. Vet. Res. 26, 803–814.

CARMICHAEL L. E., STRANDBERG J. D., F. D. BARNES (1965): Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 644-650.

CARMICHAEL, L. E. (1970): Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. J. Am. Vet. Med. Ass. 156, 1714 – 1721.

CARMICHAEL L. E., C. E. GREENE (1998): Canine herpesvirus infection. U: Infectious disease of the dog and cat. (Greene, C. E., ur.), W.B. Saunders, Philadelphia. str 28-32.

CHAPWANYA, A, T. CLEGG, P. STANLEY, L. VAUGHAN (2008): Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. Theriogenology. 70, 795–799.

CHELARU A. (2014.): Epidemiological, chemical and immunological research in canine herpesviruses. Disertacija. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Rumunjska.

CONCANNON P. W., W. HANSEL (1976): Prepartum luteolysis and hypothermia in normal and in prostaglandin treated beagle bitches. Endocrinology 98 (Suppl), 183.

CONCANNON P. W., W. HANSEL (1977): Prostaglandin $F_{2\alpha}$ induced luteolysis, hypothermia, abortions in beagle bitches. Prostaglandins. 13, 533-542.

CONCANNON, P. W., M. E. POWERS, W. HOLDER, W. HANSEL (1977): Pregnancy and parturition in the bitch. Biol. Reprod. 19, 517–526.

CONCANNON P. W., V. RENDANO (1983): Radiographicdiagnosis of canine pregnancy: Onset of fetal skeletal radiopacity in relation to times of breeding, preovulatory luteinizing hormore release and parturition. Am. J. Vet. Res. 44, 1506.

CONCANNON P. W., A. E. YEAGER (1990.): Endocrine, ultrasonographic, radiographic and clinical changes during pregnancy, parturition, and lactation in dogs. U: Proceedings of the Society for Theriogenology, 197.

CONCANNON, P. W. (2009): Endocrinologic control of normal canine ovarian function. Repro. Domest. Anim. 44, 3-15.

CONCANNON, P. W. (2011): Reproductive cycles of the domestic bitch. Anim. Repro. Sci. 124, 200-210.

COBZARIU D., G. A. NECULA , S. BĂRĂITĂREANU, G. ȘTEFAN, D. DANEȘ (2018): Canine Herpesvirus-1 specific seroconversion and clinical aspects in kennel dogs from Romania. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXIV 2.

CHRISTIANSEN, I. J. (1984): Reproduction in the Dog and Cat. Baillibre Tindall, London, str. 197-221.

DAHLBOM, M., M. JOHNSSON, V. MYLLYS, J. TAPONEN, M. ANDERSSON (2009): Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and Brucella canis in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. Reprod. Domest. Anim. 44, 128-131.

DARVELID, A. W., C. LINDE-FORSBERG (1994): Dystocia in the bitch: A retrospective study of 182 cases. J. Small Anim. Pract. 35, 402-407.

DAVIDSON, A. P. (2003): Approaches to reducing neonatal mortality in dogs. U: Recent advances in small animal reproduction. (Concannon P.W., ur). Ithaca, NY, USA: International Veterinary Information Service. Dostupno na: http://www.ivis.org

DAVIDSON, A. P., S. A. GRUNDY, J. E. FOLEY (2003): Successful medical management of neonatal canine herpesvirus: a case report. Commun. Theriogenol. 3, 1-5.

DAY, M. J., M. C. HORZINEK, R. D. SCHULTZ (2007): Guidelines for the vaccination of dogs and cats. J. Small Anim. Pract. 48, 528-541.

DECARO, N., V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2008): Canine Adenoviruses and Herpesvirus. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 38, 799–814.

DECARO, N., F. AMORISCO, C. DESARIO, E. LORUSSO, M. CAMERO, A.L. BELLACICCO, R. SCIARRETTA, M. S. LUCENTE, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2010): Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. J. Virol. Methods 169, 76–180.

DOZIOS, T. F., J. C. WAGNER, C. M. CHERMERDA, V. M. ANDREW (1949): The influence of certain serum factors on the neutralization of western equine encephalomyelitis virus. J. Immunol. 62, 319-331.

DUNNE, G, N. GURFIELD (2009): Local veterinary diagnostic laboratory, a model for the One Health Initiative. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 39, 373-384.

DUNOWSKA, M., G. MOORE1, N. CAVE, P. BIGGS1, E. ACKE1 (2018): Canine respiratory viruses in New Zeland. Proceesings of 11th International Congress for Veterinary Virology and 12th Annual Meeting of EPIZONE, 27.-30.8.2018, Beč, Austrija. str. 6.

DURHAM, P. J. K., W. S. H. POOLE (1979): Experimental canine herpesvirus infection in newborn puppies, using a New Zealand isolate. N. Z. Vet. J. 27, 14-16.

ENEROTH A., C. LINDE-FORSBERG, M. UHLHORN, M. HALL (1999): Radiographic pelvimetry for assessment of dystocia in bitches: a clinical study in two terrier breeds. J. Small Anim. Pract. 40, 257-264.

ENGLAND, G. C. W. (1998): Ultrasonographic assesment of abnormal pregnancy. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 28, 849-868.

ENGLAND, G. C. W., W. E. ALLEN (1989): Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. Br. J. Radio. 62, 642.

ENGLAND, G. C. W., W. E. ALLEN (1990a): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound; Diagnosis of early pregnancy and the number of conceptuses. J. Small Anim. Pract. 31, 321.

ENGLAND G. C. W, W. E. ALLEN (1990b): Diagnosis of pregnancy and pyometra in the bitch using real-time ultrasonography. Vet. Ann. 30, 217.

ENGLAND, G. C. W. (1990): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: Development of the conceptus and determination of gestational age. J. Small Anim. Pract. 31, 324.

ENGLAND G. C. W., W. E. ALLEN, O. J. PORTER (1990): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound; Development of the conceptus and determination of gestational age. J. Small Anim. Pract. 31, 324.

ENGLAND, G. C. W. (1992): Ultrasound evaluation of pregnancy and spontaneous embryonic resorption in the bitch. J. Small Anim. Pract. 33, 430.

ENGLAND, G. C. W., A. E. YEAGER (1993): Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 107.

ENGLAND, G. C. W., M. RUSSO, S. L. FREEMAN (2009): Folicullar dynamics, ovulation and conception rates in bitches. Reprod. Dom. Anim. 44, 53-58.

ENGLAND, G. C. W., A. VON HEIMENDAHL (2011): Physiology and endocrinology of the female. U: BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, 2nd ed.. (G. C. W. England, A. von Heimendahl, ur.), BSAVA, Gloucester, str 7.

EVANS, H. M., H. H., COLE (1931): An introduction to the study of the oestrous cycle in the dog. Mem. Univ. Calif. 9, 65–118.

EVERMANN, J. F., A. J. MCKERINAN, R. L. OTT, L. A. REED (1982): Diarrheal condition in dogs associated with viruses antigenically related to feline herpesvirus. Cornell. Vet. 72, 285–291.

EVERMANN, J. F., LEAMASTER, B. R., MCELWAIN, T. F., POTTER, K. A., MCKEIRNAN, A. J., J. S. GREEN (1984): Natural infection of captive coyote pups with a herpesvirus antigenically related to canine herpesvirus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 1288–1290.

EVERMANN, J. F. (1989): Diagnosis of canine herpetic infections. U: Current veterinary therapy: small animal practice. 10th ed. (Kirk, R.W., ur.), W.B. Saunders, London. str. 515-520.

EVERMANN, J. F., R. K. SELLON, J. E. SYKES (2006): Laboratory diagnosis of viral and rickettsial infections and epidemiology of infectious disease. U: Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed. (Greene, C., ur.). Elsevier, St. Louis. str. 1-9.

FELDMAN, E. C., R. W. NELSON (1996): Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

FIELD, H. J., S. BISWAS, I. T. MOHAMMAD (2006): Herpesvirus latency and therapy – from a veterinary perspective. Antiviral Res. 71, 127-33.

FLINT, S. J., L. W. ENQUIST, V. R. RACANIELLO (2009): Evolution and emergence. U: Principles of virology, vol 2, 3rd ed (Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., ur.). ASM Press, Washington, DC. str. 310-356.

FORD, R. B. (2006): Canine infectious tracheobronhitis. U: Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed (Greene, C. E., ur.). Elsevier Inc., St. Louis. str: 54-61.

FOLNOŽIĆ, I., T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ (2009): Vaginoskopija kuja. Vet. stn. 40, 27-36.

FRESHMANN, J. L. (2006): Pregnancy loss in the bitch. U: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. (Bonagura, J.D., D.C. Twedt, ur.), Saunders Elsevier, St. Louis, str. 986-989.

GEISER, B., O. BURFEIND, W. HEUWIESER, S. ARLT (2014): Body temperature drop in bitches prior to parturition: A reliable parameter for the prediction of parturition? 1st International Evidence –Based Veterinary Medicine Network Conference, 23 – 24 October 2014, Windsor.

GILL, M. A. (2001): Perinatal and late neonatal mortality in the dog. Disertacija. University of Sydney. Sidney.

GORDIS, L. (2009): Assessing the validity and reliability of diagnostic and screening tests. U: Epidemiology (Gordis, L., ur.). Elsevier/Saunders, New York, str. 85-108.

GRACIN, K., M. LOJKIĆ (2016): Monitoring of late gestation in Labrador retriever bitches: can variation in serum progesteron and in body temperature be enough to predict dystocia? ISCFR 2016 ABSTRACT BOOK. 22.-25. July, Paris, France. str. 75.

GRACIN, K., M. LOJKIĆ, V. STEVANOVIĆ (2017): Quick prepartal hormonal overturn in young primiparous Labrador retriever bitches: from high level of serum progesterone today to the healthy litter tomorrow. Proceedings of XXth EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Small Companion Animals, 29. July-1. June, Vienna, Austria. str. 120.

GREEN, C. E., L. E. CARMICHAEL (2006): Canine Herpesvirus infection. U: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd ed.. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 48-53.

GUIGAL, P. M., A. FONTBONNE, S. BUFF, M. VINCETTI, F. THÉVENET, S. PAVLOWIEZ, A. L. GUIOT, D. GRANDJEAN, H. POULET (2002): Prevalence of antibodies against Canine Herpes Virus in French breeding kennels. Proceedings of the third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, Liège, May 2002. Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Liège. str. 132.

GUNN-MOORE, D. (2006): Small animal neonatology: They look normal when they are born and then they die. U: Proceedings of the 31st WSAVA Congress, October 11-14, Praha. str. 714-720.

GUNSON, R. N., T. C. COLLINS, W. F. CARMAN (2006): Practical experience of high throughput real time PCR in the rotine diagnostic virology setting. J. Clin. Virol. 35, 355-367.

HANNON, W., M. A. ATKINSON, D. J. BALL, R. G. LORENZ, P. MATTSON, D. M. MOORE, R. J. WHITLEY (2004): Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, Fluorescence, and Luminescence Immunoassay; NCCLS, I/LA23 Approved Guidelines. Wayne, PA.

HARDER T. C., M. HARDER, R. I. DE SWART, A. D. OSTERHAUS, B. LIESS (1998): Major immunogenic proteins of phocid herpes-viruses and their relationship to proteins of canine and feline herpesviruses. Vet. Q., 20, 50-55.

HASHIMOTO, A., K. HIRAI, T. YAMAGUCHI, Y. FUJIMOTO (1982): Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 43, 844–850.

HASHIMOTO, A., K. HIRAI, Y. SUZUKI, Y. FUJIMOTO (1983): Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. Am. J. Vet. Res. 44, 610–614.

HASHIMOTO A., K. HIRAI (1986): Canine herpesvirus infection. U: Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. 2nd ed. (Morrow, D.A., ur.), W.B. Saunders , London. str. 516-520.

HILL, H., C. J. MARE (1974): Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 35, 669–73.

HOSPES R., B. R. RICHTER, A. RIESENBECK, H. BOSTEDT (2004): Untersuchungen zur Zuverlassigkeit handelsublicher Progesteron-Schnelltests in der gynakologischen Diagnostik beim Hund. Tierarztl Prax 32, 247–251.

HUXSOLL D. L., I. E. HEMELT (1970): Clinical observations of canine herpesvirus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156, 1706-1713.

INDREBØ, A., C. TRANGERUD, L. MOE (2007): Canine neonatal mortality in four large breeds. Acta Vet. Scand. 49, Suppl 1: S2. 2-10.

JACKSON, P. G. G. (2004): Handbook of Veterinary Obstetrics. (Jackson, P.G.G., ur.). W.B. Sounders, Philadelphia, str. 141-166.

JOHNSTON, S. D. (1982): Canine theriogenology. J. Soc.Theriogenol. 1, 11.

JOHNSTON, S. D. (1996): Canine pregnancy length from serum progesterone concentrations of 3-32 nmol/l (1 to 10 ng/ml). In: Proceedings of the Symposium on Canine and Feline Reproduction, Sydney.

JOHNSTON, S. D., M. V. ROOT-KUSTRITZ, P. N. S. OLSON (2001): The neonate – from birth to weaning. U: Canine and feline theriogenology (Johnston, S. D., M. V. Root-Kustritz, P. N. S. Olson, ur.). W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. str. 146-167.

JOHNSTON, S. D., OLSON, P. N., ROOT-KUSTRITZ, M. V. (2001.b) Canine parturition—eutocia and dystocia. U: Canine and Feline Theriogenology (Johnston, S. D., M. V. Root-Kustritz, P. N. S. Olson, ur.). WB Saunders Co, Philadelphia, Pennsylvania. str. 105–128.

JONES, D. E., J. 0. JOSHUA (1988): Reproductive Clinical Problems in the Dog, 2nd ed. (Jones, D. E., J.0. Joshua, ur.), Wright, London, str. 80-112.

KAKUK T. J., G. H. CONNER, R. F. LANGHAM, J. A. MOORE, J. R. MITCHELL (1969): Isolation of a canine herpesvirus from a dog with malignant lymphoma. Am. J. Vet. Res. 30, 1951-1960.

KAKUK, T. J., G. H. CONNER (1970): Experimental canine herpesvirus in the gnotobiotic dog. Lab. Anim. Care 20, 69-79.

KAPIL, S. (2015): Canid herpesvirus 1 (CHV-1)–related disease in older puppies and CHV-1 shedding in the vagina of adult pregnant dogs. J. Vet. Diagn. Invest. 27, 758-761.

KAWAKAMI, K., O. HIROYUKI, K. MAEDA, A. IMAI, E. OHASHI, S. MATSUNAGA, Y. TOHYA, T. OHSHIMA, M. MOCHIZUKI (2010): Nosocomial Outbreak of Serious Canine Infectious Tracheobronchitis (Kennel Cough) Caused by Canine Herpesvirus Infection. J. Clin. Microbiol., 48, 1176-1181.

KENNEDY, M. (2005): Methodology in diagnostic virology. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 8, 7-26.

KIM, O. (2004): Optimization of in situ hybridization assay using nonradioactive DNA probes for the detection of canine herpesvirus (CHV) in paraffin-embedded sections. J. Vet. Sci. 5, 71-3.

KIM, Y., A. J. TRAVIS, W. N. MEYERS-WALLEN (2007): Parturition prediction and timing of canine pregnancy. Theriogenology. 68, 1177-1182.

KIMBER, K. R., G. V. KOLLIAS, E. J. DUBOVI (2000): Serologic survey of selected viral agents in recently captured wild North American river otters (*Lontra canadensis*). J. Zoo Wildl. Med. 31, 168–175.

KNELLER, S. K. (1986): Radiographic examination. U: Small Animal Reproduction and Infertility, a Clinical Approach to Diagnosis and Treatment. (Burke, T.J., ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, str 158.

KRAFT, S., J. F. EVERMANN, A. J. McKEIRNAN, M. RIGGS (1986): The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 8, 688-696.

KRAKOWKA, S., A. CONFER, A. KOESTNER (1974): Evidence for transplacental transmission of canine distemper virus: Two case reports. Am. J. Vet. Res. 35, 1251-1253.

KRAKOWKA, S. (1985): Canine herpesvirus-1. U: Comparative pathobiology of viraldisease. (Olsen, R. G., S. Krakowka, J. R. Blakeslee, ur.), CRC Press, Boca Raton. str. 137–144.

KROGENÆS, A., V. ROOTWELT, S. LARSEN, E.K. SJŘBERG, B. AKSELSEN, T. M. SKĹR, S. S. MYHRE, L. H. M RENSTRÖM, B. KLINGEBORN, A. LUND (2012): A serological study of canine herpes virus −1 infection in the adult dog population. Theriogenology. 78, 153–158.

KROGENÆS, A., V. ROOTWELT, S. LARSEN, L. RENSTROM, W. FARSTAD, A. LUND (2014): A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. Acta Vet. Scand. 56, 19.

KUTZLER, M. A., H. O. MOHAMMED, S. V. LAMB, V. N. MEYERS-WALLEN (2003.a): Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. Theriogenology. 60, 1187-1196.

KUTZLER, M. A., H. O. MOHAMMED, S. V. LAMB, V. N. MEYERS-WALLEN (2003.b): Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurments obtained by ultrasonography. Theriogenology. 60, 1309-1317.

LACHERETZ A., S. COGNARD (1998): Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpèsvirose canine. Rev. Méd.Vét. 149, 853-856.

LARA, E. G. V., J. I. Á. SOLIS, C. C. VERDE, J. A. M.CRESPO, L. C. MARÍN, J. C. DEL RÍO GARCÍA, G. V. ANDA (2016.a): Canine Herpesvirus Seroprevalence and Associated Factors in Dogs of Mexico. O. J. Vet. Med. 6, 149-162.

LARA, E. G. V., B. L. B. ROMERO, C. L. MARÍN, J. I. Á. SOLIS, S. G. GALLARDO, C. C. VERDE, J. A. M. CRESPO, G. V. ANDA (2016.b): Pathology Isolation and Identification of Canine Herpesvirus (CHV-1) in Mexico. O. J. Pathology. 6, 111-121.

LARSEN, R. W., M. KIUPEL, H. J. BALZER, J. S. AGERHOLM (2015): Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stilborn and dead neonatal puppies in Denmark. Acta Vet. Scand. 57, 1.

LAWLER, D. F. (2008): Neonatal and pediatric care of the puppy and kitten. Theriogenology 70, 384-392.

LEBICH, M., T. C. HARDER, H. R. FREY, I. K. VISSER, A. D. OSTERHAUS, B. LIESS (1994): Comparative immunological characterization of type-specific and conserved Bcell epitopes of pinniped, felid and canid herpesviruses. Arch. Virol. 136, 335-347.

LEDDY, J. P., R. L SIMONS, R. G. DOUGLAS (1977): Effect of selective complement deficiency on the rate of neutralization of enveloped vinrses by human sera. J. Immunol. 118, 28-34.

LENARD, Z. M., B. J. HOPPER, N. V. LESTER (2007.): Accuracy of prediction of canine litter size and gestation age with ultrasound. Aust. Vet. J. 85, 222-225.

LI, Y., C. HUANG, J. KLINDT, L. L. ANDERSON (1993): Stimulation of prolactin secretion in the pig: central effects of relaxin and the antiprogesterone RU 486. Endocrinology. 133, 1205–1212.

LINDE-FORSBERG C., A. ENEROTH (2000): Abnormalities in pregnancy, parturition and the periparturient period. U: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 5th ed. (Ettinger, S.J., E.C. Feldman, ur.), W.B. Saunders, Philadelphia, str. 1527-1539.

LOPATE, C. (2012): Reproductive Physiology of Canine Pregnancy and Parturition and Conditions of the Periparturient Period. U: Management of Pregnant and Neonatal Dogs, Cats, and Exotic Pets, First Edition (Lopate, C., ur.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Yersey, SAD. str. 25-35.

LUST G., L. E. CARMICHAEL (1974): Properties of canine herpesvirus DNA. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 213-217.

LUVONI, G. C., A. GRIONI (2000): Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements. J. Small Anim. Pract. 41, 292-294.

LUVONI, G. C., M. BECCAGLIA (2006): The prediction of parturition date in canine pregnancy. Repr. Dom. Anim. 41, 27-32.

LUVONI, G. C., M. BECCAGLIA, P. ANASTASI (2009): Ultrasonographic fetal biometry in bitches and queens. U: Proceedings 6th Annual Congress EVSSAR, Wroclaw, June 6th, str. 30-31.

LOPATE, C. (2008): Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. Theriogenology. 70, 397-402.

MACLACHLAN, N. J., E. J. DUBOVI (2011): Laboratory diagnosis of viral diseases. U: Fenner's VeterinaryVirology, 4th ed. (MacLachlan, N. J., E. J. Dubovi, ur.). Academic Press, New York. str. 101-124.

MAEDA, K., X. XUAN, Y. KAWAGUCHI, M. ONO, N. YOKOYAMA, K. FUJITA (1997): Characterization of canine herpesvirus gly-coprotein D (hemagglutinin). J. Vet. Med. Sci. 59, 1003-1009.

MANNING A., A. BUCHAN, G. R. B. SKINNER, J. DURHAM, H. THOMPSON (1988): The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. J. Gen. Virol. 69, 1601-1608.

MANTZIARAS, G., K. TELIOUSIS, O. MAVROPOULOU, A. PSEFTOGAS, G. C. LUVONI (2016): First documented report of CHV-1 infection of a pregnant bitch in Greece. U: Proceedings of XIX International Symposium on Canine and Feline Reproduction; 29-31 lipanj 2016; Paris, Francuska. EVSSAR; str 8.

MANNING, A., A. BUCHAN, G. R. B. SKINNER, J. DURHAM, H. THOMPSON (1988): The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. J. Gen. Virol. 69, 1601-1608.

MARTINA, B. E., T. C. HARDER, A. D. OSTERHAUS (2003): Genetic characterization of the unique short segment of phocid herpesvirus type 1 reveals close relationships among alphaherpesviruses of hosts of the order Carnivora. J. Gen. Virol. 84, 1427–1430.

MEDCALC SOFTWARE BVBA (2019): MedCalc Statistical Software, version 19. Ostend, Belgium.

MEYERS-WALLEN, V. N. (1995.): The elective Cesarean section. U: Current Veterinary Therapy XII (Bongoura, J. D., Kirk, R.W., ur.). W.B. Saunders, Philadelphia. str. 1085-1089.

MILA, H., A. GRELLET, M. DELEBARRE, C. MARIANNI, A. FEUGIER, S. CHASTANT-MAILLARD (2017): Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. Prev. Vet. Med. 143, 11–20.

MIYOSHI, M., Y. ISHII, M. TAKIGUCHI, A. TAKADA, J. YASUDA, A. HASHIMOTO, K. OKAZAKI, H. KIDA (1990): Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. J. Vet. Med. Sci. 61, 375-379.

MONINO, A., P. DRI, M. BECCAGLIA, G. MILITE (2012): Accurate determination of serum progesterone using a Fluorescence Enzyme Immunoassay in the bitch. U: Proceedings of the 7th Quadrennial International Symposium Canine and Feline Reproduction; 26-29 July 2012, Whistler, Canada. str. 167-168.

MOTOHASHI, T., M. TAJIMA (1966): Isolation of a canine herpes virus from a diseased adult dog in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 28, 307-314.

MÜNNICH, A. (2008): The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. Vet. Res. Commun. 32, 81–85.

MURPHY, F. A., E. P. J. GIBBS, M. C. HORZINEK, M. J. STUDDERT (1999): Properties of herpes viruses. U: Veterinary virology. 3rd ed. Academic Press. London. 303-309.

MUSAYEVA, K., J ŠENGAUT, S. PETKEVIČIUS, A. MALAKAUSKAS, G. GERULIS, A. ŠALOMSKAS (2013): Seroprevalence of canine herpes virus in lithuanian dog population. Vet. Med. Zoot. 61, 48-52.

NAKAMICHI, K., K. OHARA, Y. MATSUMOTO, H. OTSUKA (2000): Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells, J. Vet. Med. Sci. 62, 965–970.

NOTHLING, J. O., D. HUSSY, D. STECKLER, M. ACKERMANN (2008): Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. Theriogenology. 69, 276–282.

OKUDA, Y., A. HASHIMOTO, T. YAMAGUCHI, H. FUKUSHI, S. MORI, M. TANI, K. HIRAI, L. E. CARMICHAEL (1993): Repeated Canine Herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. Cornell Vet. 83, 291-302.

PAPAGEORGIOU, K. V., N. M. SUÁREZ, G. S. WILKIE, M. MCDONALD, E. M. GRAHAM, A. J. DAVISON (2016): Genome Sequence of Canine Herpesvirus. PLoS ONE, 11, e0156015. Dostupno na: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156015

PERCY, D. H., J. F. MUNNEL, H. J. OLANDER, L. E. CARMICHAEL (1970): Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. Am. J. Vet. Res. 31, 145-156.

PHARR, J. W., K. POST (1992): Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. Vet. Radiol. Ultrasound. 33, 35-40.

PLUMMER G., C. GOODHEART, D. HENSON, C. BOWLING (1969): A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. Virology. 39, 134-137.

POFFENBARGER, E. M., S. L. RALSTON, M. L. CHANDLER (1990): Canine neonatology. Part I. Physiologic differences between puppies and adults. Compend. Cantin. Educ. Pract. Vet. 12, 1601-1627.

POFFENBARGER, E. M., P. N. OLSON, S. L. RALSTON (1991): Canine neonatology. Part II. Disorders of the neonate. Compend. Cantin. Educ. Pract. Vet. 13, 25-37.

POSTE G., N. KING (1971): Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. Vet. Rec. 88, 229 –233.

POULET, H., P. M. GUIGAL, M. SOULIER, V. LEROY, G. FAYET, J. MINKE (2001): Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. Vet. Rec. 148, 691–695.

POULET H., P. DUBOURGET (1993): L'herpèsvirose canine. Point. Vet. 25, 69-75.

PRATELLI, A., V. COLAO, M. LOSURDO (2014): Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. Vet. J. 200, 257–260.

READING M. J., H. J. FIELD (1999): Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. Res. Vet. Sci. 66, 273-275.

READING, M. J., H. J. FIELD (1998): A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. Arch. Virol. 143, 1477–1488.

REMOND, M., P. SHELDRICK , F. LEBRETON, P. NARDEUX, T. FOULON (1996): Gene organization in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. J. Gen. Virol. 77, 37-48.

RENDANO, V. T. (1983): Radiographic evaluation offetal development in the bitch and fetal death in the bitch and queen. U: Current Veterinary Therapy VIII (Kirk, R.W., ur.). W.B. Saunders, Philadelphia. str. 947.

RICHARDSON, J. A. (2000): Accidental ingestion of acyclovir in dogs: 105 reports. Vet. Hum. Toxicol. 42, 370-371.

RIJSEWIJK, F. A. M., E. J. LUITEN, F. J. DAUS, R. W. VAN DER HEIJDEN, J. T. VAN OIRSCHOT (1999): Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. Vet. Microbiol. 65, 1–7.

RIVERS, B., G. R. JOHNSTON (1991.): Diagnostic imaging of the Reproductive Organs of the Bitch: Methods and Limitations. Vet. Clin. North Am. Pract.: Small Anim. Pract. 21, 437-466.

ROBINSON B., D. E. NOAKES (2019): Reproductive Physiology of the Female. U: Veterinary Reproduction and Obstetrics 10th ed (Noakes, D. E., Parkinson, T. J. i England, G. C. W., ur.). Elsevier, Amsterdam, Nizozemska. str. 2-35.

ROBINSON, A. J., S. K. CRERAR, N. WAIGHT SHARMA, W. J. MULLER, M. P. BRADLEY (2005): Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. Aust. Vet. J. 83, 356–361.

ROMAGNOLI, S. (2007): Parturition in the bitch and queen: criteria to distinguish between normal and abnormal process and clinical approach to dystocia. Dostupno na: http:// www.ivis.org

RONSSE, V., J. VERSTEGEN, K. ONCLIN, A.L. GUIOT, C. AEBERLE´, H.J. NAUWYNCK (2002): Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 1997–1998. Reprod. Dom. Anim. 37, 299–304.

RONSSE, V., J. VERSTEGEN, K. ONCLIN, F. FARNIR, H. POULET (2004): Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). Theriogenology 61, 619–636.

RONSSE, V., J. VERSTEGEN, E. THIRY, K. ONCLIN, C. AEBERLE, S. BRUNET, H. POULET (2005): Canine herpesvirus-1 (CHV-1): Clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. Theriogenology 64, 61–74.

ROSSI, C. R., G. K. KIESEL (1976): Antibody class and complement requirement of neutralizing antibodies in the primary and secondary antibody response of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. Arch.Virol. 51, 191-198.

ROOTWELT, V., A. LUND, A. KROGENÆS (2011): Herpes virus infection in the dog – a review. Eur. J. Comp. Anim. Prac, 21, 1–7.

ROTA, P. A., R. K. MAES, J. F. EVERMANN (1986): Biochemical and antigenic characterisation offeline herpesvirus-1-like isolates from dogs. Arch. Virol. 89, 57–68.

ROTA, P. A., R. K. MAES (1990): Homology between feline herpesvirus-1 and canine herpesvirus. Arch. Virol. 115, 139–145.

SCHULZE, C., W. BAUMGÄRTNER (1998): Nested polymerase chain reaction and *in situ* hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. Vet. Pathol. 35, 209-217.

SCHWEIZER, C. M., V. N. MEYERS-WALLEN (2000): Medical management of dystocia and indications for cesarean section in the bitch. U: Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice (Bonagura, J. D., ur.). Saunders, Philadelphia. str. 933-939.

SEO, I. B., W. W. SEONG, C. H. LIM (1994): Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. Korean J. Vet. Res. 34, 647-652.

SHEAHAN, B. J., P. J. TIMONEY, D. F. McHENRY (1978): Canine herpesvirus infections in a litter of greyhound pups. Ir.Vet. J. 32, 153-156.

SHINKAI, A., K. HOSHINO (1975): Complement requirement of neutralizing antibodies in different classes of immunoglobulin appearing in rabbits and guinea pigs after primary booster immunizations with herpes simplex virus. Jpn. J. Microbiol. 19, 25-34.

SHILLE, V. M., J. GONTAREK (1985): The use of ultrasonography for pregnancy diagnosis in the bitch. J.A.V.M.A. 187, 1021.

STRÖM HOLST, B., M. HAGBERG GUSTAVSSON, M. GRAPPERON-MATHIS, I. LILLIEHÖÖK, A. JOHANNISSON, M. ISAKSSON, A. LINDHE, E. AXNÉR (2012): Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. Reprod. Domest. Anim. 6, 362–365.

SOCHA, P., T. JANOWSKI, A. BANCERZ-KISIEL (2015): Ultrasonographic fetometry formulas of inner chorionic cavity diameter and biparietal diameter for medium-sized dogs can be used in giant breeds. Theriogenology. 84, 779–783.

STEINETZ B. G., L. T. GOLDSMITH, S. H. HASAN, G. LUST (1990): Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin or oestradiol-17beta in the pregnant bitch. Endocrinol. 127, 1057-1063.

ŠEHIĆ, M., D. STANIN, V. BUTKOVIĆ (2006): Ultrasonografija abdomena i toraksa psa i mačke. Veterinarski fakultet. Zagreb.

TAKUMI, A., K. KUSANAGI, K. TUCHIYA, X. XUAN, M. AZETAKA, E. TAKAHASHI (1990): Serodiagnosis of Canine Herpesvirus Infection : Development of an Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay and Its Comparison with Two Improved Methods of Serum Neutralization Test. Jpn. J. Vet. Sci. 152, 241-250.

TANAKA, T., S. NAKATANI, X. XUAN (2003): Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. Antiviral. Res. 60, 193-199.

TAVERNE, M, NOAKES D. E. (2019): Parturition and the Care of Parturient Animals and the Newborn. U: Veterinary Reproduction and Obstetrics 10th ed (Noakes, D. E., Parkinson, T. J. i England, G. C. W., ur.). Elsevier, Amsterdam, Nizozemska. str. 115-148.

TAVERNE M., D. E. NOAKES (2019): Pregnancy and Its Diagnosis. U: Veterinary Reproduction and Obstetrics 10th ed (Noakes, D. E., Parkinson, T. J. i England, G. C. W., ur.). Elsevier, Amsterdam, Nizozemska. str.78-115.

TAVERNE, M. A. M., A. C. OKKENS, H. A. VAN OORD (1990): Pregnancy diagnosis in the dog: A comparasion between abdominal palpation and linear array real-time echography. Vet. Q. 7, 249.

TANIGUCHI, S., K. YOSHINO (1965): Studies on the neutralization of herpes simplex virus. II. Analysis of complement as the antibody-potentiating factor. Virology 26, 54-60.

TIBCO SOFTWARE INC. (2017): Statistica (data analysis software system), version 13.

TIMM, S. F., L. MUNSON, B. A. SUMMERS (2009): A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (Urocyen littoralis catalinae). J. Wildlife Dis. 45, 333-343.

THIRY, E., J. SALIKI, A. SCHWERS, P. P. PASTORET (1985): Parturition as a stimulus of IBR reactivation. Vet. Rec. 116, 599–600.

TØNNESSEN R., K. S. BORGE, A. NØDTVEDT, A. INDREBØ (2012): Canine perinatal mortality: a cohort study of 224 breeds. Theriogenology, 77, 1788-1801.

TRUYEN, U., T. MULLER, R. HEIDRICH, K. TACKMANN, L.E. CARMICHAEL (1998): Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. Epidemiol. Infect. 121, 433-440.

TYACK, S. G., M. J. STUDDERT, M. A. JOHNSON (1997): Nucleotide sequence of canine herpesvirus homologues of herpes simplex virus type 1 US2, US3, glycoproteins I and E, US8.5 and US9 genes. DNA Seq. 7, 365-368.

YEAGER, A. E., P. W. CONCANNON (1990): Association between the preovulatory luteinizing hormone surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and foetal heartbeats in Beagle dogs. Theriogenology 34, 655.

YEAGER, A. E., MOHAMMED H. O., MEYERS-WALLEN V. (1992): Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles. Am. J. Vet. Res. 53, 342.

YESILBAG, K., E. YALCIN, P. TUNCER, Z. YILMAZ (2012): Seroprevalence of canine herpsivirus-1 in Turkish dog population. Res. Vet. Sci. 92, 36-39.

VALLET, J. L., J. R. MILES, L. A. REMPEL (2013): A simple novel measure of passive transfer of maternal immunoglobulin is predictive of preweaning mortality in piglets. Vet. J. 195, 91-97.

VANDEVANTER D. R., P. WARRENER, L. BENNETT, E. R. SCHULTZ, S. COULTER, R. L. GARBER, T. M. ROSE (1996): Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. J. Clin. Microbiol. 34, 1666–1671.

VAN DER WEIJDEN, G. C., M. A. M. TAVERNE (1994): Aspects of obstetric care in the dog. Vet. Q. 16, 20-22.

VAN GUCHT, S., H. NAUWYNCK, M. PENSAERT (2001): Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. Vlaam. Diergeneeskd. Tijdschr. 70, 204 - 211.

VERSTEGEN, J. P., L. D. M. SILVIA, K. ONCLIN, I. DONNAY (1993): Echocardiographic study of heart rate in dog and cat fetuses in utero. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 174–80.

VOGTLIN, A., C. FRAEFEL, S. ALBINI (2002): Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 519-523.

XUAN, X., T. HORIMOTO, J. A. LIMCUMPAO, A. TAKUMI, Y. TOHYA, E. TAKAHASHI, T. MIKAMI (1991): Neutralizing determinants of canine herpesvirus as defined by monoclonal antibodies. Arch. Virol. 116, 185-195.

XUAN, X., T. HORIMOTO, J. A. LIMCUMPAO, Y. TOHYA, E. TAKAHASHI, T. MIKAMI (1992): Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. Arch. Virol. 122, 359-365.

WATSON, P. F., A. PETRIE (2010): Method agreement analysis: A review of correct methodology. Theriogenology. 73, 1167-1179.

WILLOUGHBY, K., M. BENNETT, C. M. MCCRACKEN, R. M. GASKELL (1999): Molecular phylogenetic analysis of felid herpesvirus 1. Vet. Microbiol. 69, 93–97.

WYKES, P. M., P. N. OLSON (2003): Normal and abnormal parturition. U: Textbook of Small Animal Surgery, 3rd ed (Slatter, D. H., ur.). W.B. Saunders, Philadelphia. str. 1510-1517.

ZONE, M. A., M. M. WANKE (2001): Diagnosis of canine fetal health by ultrasonography. J. Reprod. Fertil. 57, 215–219.

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Koraljka Gracin, univ. mag. vet. med. rođena je u Zagrebu 1979. godine. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine završava diplomski studij a 2009. godine završava postdiplomski specijalistički studij, smjer „Uzgoj i patologija domaćih mesoždera“. Doktorski studij upisuje 2010. godine.

Tokom poslijediplomskog studija radi u privatnoj veterinarskoj ambulanti 'Goldi' u Zagrebu, u periodu od 2005. do 2012. godine. U tom periodu odrađuje vježbenički staž, polaže stručni te državni ispit. Od 2011. do 2017. godine vodi veterinarsku službu Centra za rehabilitaciju Silver u Zagrebu. Od 2017. godine osniva privatnu Specijalističku praksu za male životinje 'LunimirVet' u Zagrebu.

U sklopu CEEPUS stipendije, od 11.10.2004. do 11.02.2005. godine boravi na klinikama Veterinarskog fakulteta u Wroclawu, Poljska te od 1.10.2011. do 1.11.2011. na Klinici za reprodukciju na Veterinarskom fakultetu u Budimpešti.

Tokom svog rada aktivno sudjeluje na nizu kongresa i radionica u Hrvatskoj i u Europi. Aktivan je član Europskog udruženja veterinara za reprodukciju malih životinja (EVSSAR) od 2011. godine i Hrvatske veterinarske komore.

GRACIN, K., GEREŠ, D., ŽUBČIĆ, D. (2007): Dopamin Agonist and Prostaglandin F2alpha analogues combination. Proceedings of XIIIth European FECAVA Congress & VII Croatian Small Animal Veterinary Days, 29. ožujak – 1. travanj. str. 100-101.

GRACIN, K., ŠPOLJARIĆ, B., GEREŠ, D. (2013): Poticanje pobačaja u kuja kombinacijom dopaminskih agonista i prostaglandina F2alfa. Zbornik radova Veterinarski dani, Opatija, Hrvatska. str. 257-267.

GRACIN, K., M. LOJKIĆ, LJ. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ (2016): Prikaz tri slučaja infekcije psećim herpesvirusom tip 1 (CHV-1) u Republici Hrvatskoj. Zbornik 6. Hrvatskog veterinarskog kongresa, 26-29. listopad, Opatija, Hrvatska. str. 489-493.

GRACIN, K., M. LOJKIĆ (2016): Monitoring of late gestation in Labrador retriever bitches: can variation in serum progesteron and in body temperature be enough to predict dystocia? ISCFR 2016 ABSTRACT BOOK.22.-25. July, Paris, France. str. 75.

GRACIN, K., M. LOJKIĆ, V. STEVANOVIĆ (2017): Quick prepartal hormonal overturn in young primiparous Labrador retriever bitches: from high level of serum progesterone today to the healthy litter tomorrow. Proceedings of XXth EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Small Companion Animals, 29. July-1. June, Vienna, Austria. str. 120.

GRACIN, K., M. MAURIĆ, LJ. BARBIĆ, V. STAREŠINA, M. LOJKIĆ, V. STEVANOVIĆ (2018): Difficulties in diagnosis and new insights in risk factors of canid alphaherpesvirus -1 infection. Proceedings of 21st EVSSAR Congress Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Small Companion Animals, 22.-23. June,Venice, Italy. str. 190.

GEREŠ, D., K. GRACIN, D. ŽUBČIĆ (2007): Treatment of pseudopregnancy with Pyridoxine according to the principles of the orthomolecular medicine. Proceedings of XIIIth European FECAVA ongress & VII Croatian Small Animal Veterinary Days. Cavtat, Hrvatska, 29. ožujak – 1. travanj. str. 63-64.

GEREŠ, D., B. ŽEVRNJA, D. ŽUBČIĆ, R. ZOBEL, B. VULIĆ, N. STAKLAREVIĆ, K. GRACIN (2011): Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. Veterinarski arhiv, 81, 2, 187-198.

GEREŠ, D., VINCE, S., GRACIN CRNKOVIĆ, K., ŠPOLJARIĆ, B. (2013): Indukcija estrusa u kuja sa eCG i hCG. Zbornik radova Veterinarski dani, Opatija, Hrvatska, 9.-12. listopad. str. 247-256.

ŠPOLJARIĆ, B., D. GEREŠ, K. GRACIN-CRNKOVIĆ (2012): Poticanje pobačaja u kuja kombinacijom sintetskih analoga dopaminskih agonista i PGF2alfa. Zbornik predavanja Naučnog simpozijuma Reprodukcija domaćih životinja i bolesti novorođenčadi. Divčibare, Srbija, 4-7. September. str. 149-154.

ŠPOLJARIĆ, B., D. SVOBODA, S. VINCE, J. GRIZELJ, D. ŠPOLJARIĆ, I. STOLIĆ, M. POPOVIĆ, I. FOLNOŽIĆ, T. DOBRANIĆ, K. GRACIN, D. GEREŠ, M. SAMARDŽIJA (2018): Farmakološke metode indukcije pobačaja u kuja. Veterinarska stanica, 49, 6, 441-453.