SEROPREVALENCIJA TE ODREĐIVANJE ANTIGENSKIH I GENSKIH OBILJEŽJA VIRUSA INFLUENCE SVINJA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Jungić, Andreja

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:057518

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

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

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Andreja Jungić

SEROPREVALENCIJA TE ODREĐIVANJE ANTIGENSKIH I GENSKIH OBILJEŽJA VIRUSA INFLUENCE SVINJA U REPUBLICI HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Andreja Jungić

SEROPREVALENCE, ANTIGENIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE INFLUENZA VIRUS IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Andreja Jungić

SEROPREVALENCIJA TE ODREĐIVANJE ANTIGENSKIH I GENSKIH OBILJEŽJA VIRUSA INFLUENCE SVINJA U REPUBLICI HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Vladimir Savić

akademik Josip Madić

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Andreja Jungić

SEROPREVALENCE, ANTIGENIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE INFLUENZA VIRUS IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Vladimir Savić, PhD

academic Josip Madić

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Andreja Jungić 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, 2018.

Disertacija je izrađena u Odjelu za virologiju i Centru za peradarstvo Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

Zahvala

Zahvaljujem svojim mentorima, dr.sc. Vladimiru Saviću i akademiku Josipu Madiću na stručnom i znanstvenom vodstvu tijekom doktorskog studija te nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije. Hvala vam na preporukama za poboljšanje kakvoće doktorske disertacije.

Zahvalu upućujem dr.sc. Besi Roić, ponajprije na pomoći pri odabiru teme istraživanja, a zatim na podršci tijekom izrade disertacije zajedno s mojim suradnicama u Laboratoriju - Ivani Pišćak i Anđelki Borošak.

Dragoj prijateljici i znanstvenici, dr.sc. Heleni Grgić sa Sveučilišta u Guelphu koja je nesebično i strpljivo prenosila na mene svoje znanje i iskustvo kroz brojne razgovore i diskusije. Najveća joj hvala na podršci i prijateljstvu. Ovu disertaciju posvećujem njoj.

Profesoru Zvonimiru Poljaku zahvaljujem što je uvijek našao vrijeme za odgovore na moja pitanja i nedoumice tijekom studija, neizmjerno mu hvala na trudu i pomoći.

Izv.prof.dr.sc. Ljubi Barbiću hvala na podršci kad se sve činilo nedostižnim.

Hvala svim mojim suradnicama u Odjelu za virologiju, doc.dr.sc. Loreni Jemeršić na korisnim savjetima, posebno dr.sc. Jeleni Prpić na pomoći u molekularnoj dijagnostici, Ines Nini Ugrin na strpljivosti u prenošenju znanja i pomoći pri izdvajanu virusa influence na staničnoj kulturi i Ivani Prajdić na stvaranju poticajne radne sredine.

Naposljetku, hvala mom životnom partneru i kolegi dr.sc. Dinku Novoselu na strpljenju i razumijevanju te velikoj pomoći pri izradi ove disertacije. Najdražem članu moje obitelji, Tinu, najviše sam zahvalna na pažnji i dobroti.

Audaces fortuna iuvat.

SAŽETAK

Virus influence tipa A važan je uzročnik dišnih bolesti kojim se mogu zaraziti različite vrste životinja. Infekcija virusom influence u svinja javlja se u obliku enzootija svugdje u svijetu čineći pri tome ekonomske gubitke. Glavna osobina virusa influence tipa A je njihova sposobnost mijenjanja antigenske strukture što posljedično uzrokuje stvaranje novih podtipova virusa. Svinja može istovremeno biti inficirana i virusima influence ptica i ljudi te je idealan medij za preslagivanje gena, a virusne presloženice koje pri tom nastaju mogu probiti barijeru vrste. S ciljem određivanja seroprevalencije u RH, imunoenzimnim testom za dokazivanje protutijela za nukleoprotein (NP) virusa influence svinja pretraženo je 1536 uzoraka krvnog seruma svinja, a protutijela za NP virusa influence svinja utvrđena su u 466 (30,3 %) uzoraka. Postupkom inhibicije hemaglutinacije (IHA) utvrđeno je da je najzastupljeniji podtip u uzgojima bio H1N1 (44,6%), zatim slijedi H3N2 (42,7%) i H1N2 (26,3%), a u 62,19% uzoraka krvnog seruma svinja utvrđena su protutijela za barem jedan podtip. Imunohistokemijskom metodom pretraženo je 28 uzoraka tkiva pluća na prisutnost VIS od kojih je u 8 utvrđen antigen VIS. Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RT PCR) od 142 pretražena uzorka plućnog tkiva, gen M bio dokazan u 9 uzoraka. Gen M VIS također je bio dokazan u 7 od 29 ukupno pretraženih nazofaringealnih obrisaka. Metodom RT-PCR dokazali smo ciljane odsječke gena HA i NA u 6 uzoraka pluća i 3 uzorka nazofaringealnih obrisaka.
Rezultati prikazani ovom disertacijom upotpunili su prve spoznaje o prisutnosti virusa influence svinja u Republici Hrvatskoj.

Ključne riječi: virus influence svinja, svinje, seroprevalencija, imunohistokemija, genska raznolikost, Hrvatska

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION

Swine influenza (SI) is an important viral disease caused by influenza A viruses that belong to the family *Orthomyxoviridae*. Influenza A viruses (IAV) are characterised by subtype of the two major surface glycoproteins, haemagglutinin and neuraminidase. The natural reservoir for IAVs are waterfowls, but both human and swine are also considered as its hosts. Swine has been considered as a „mixing vessel“ of new IAVs because of its susceptibility to infection with IAVs of different host origin. This doctoral thesis reports on a serological and virological survey for swine influenza virus (SIV) in pig population in Croatia.

METHODS

A total of 1536 blood sera samples were investigated for presence of SIV antibodies and 410 sera samples were examined for presence of HA antibodies by haemagglutination inhibition (HI) assay. 142 lung samples and 29 nasal swabs were investigated by molecular methods of SIV detection, with generic primers capable of detecting M gene which is common to all influenza A viruses. Due to subtyping od SIV, amplification of HA and NA gene fragments was performed and phylogenetic analysis was done. Detection of SIV antigen was made by IHC in lung samples collected post mortem.

RESULTS

In total of 1536 examined blood sera samples by ELISA, antibodies for SIV nucleoprotein (NP) were detected in 466 (30.3%). Results made by HI indicate that the most common subtype of SIV in Croatian pig population was H1N1 (44.6%), followed by H3N2 (42.7%) and H1N2 (26.3%). Antibodies against at least one subtype were detected in 62.19% of the blood sera samples. SIV antigen was detected in 8 of 28 lung tissue samples. M gene was detected in 9 of 142 lung tissue samples and in 7 of 29 nasopharyngeal swab samples.

Phylogenetic analysis of amplified HA and NA gene fragments in 9 Croatian isolates indicates the presence of subtype H1N1 virus of wholly avian origin.

CONCLUSIONS

Different H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses circulate in Europe. Some of those viruses are widespread but there is also a regional variability. There results demonstrated that subtypes H1N1, H1N1 and H3N2 are circulating in pig population in Croatia. Pandemic strain H1N1pdm which is circulating in some European countries is still not detected in Croatia. The continuous monitoring, surveillance and molecular characterization of the circulating SIVs is of major concern. Understanding the role of swine in spreading of these circulating viruses is necessary.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA
2.1. Povijest influence svinja 3
2.1.1. Evolucija virusa influence tipa A 4
2.2. Pregled rasprostranjenosti influence svinja 4
2.2.1. Pregled dosadašnjih istraživanja u Europi 6
2.2.2. Pregled istraživanja u Americi i Aziji 7
2.2.3. Istraživanja influence svinja provedena u Hrvatskoj 8
2.3. Podtipovi virusa influence A u svinja i pregled pojavnosti 10
2.3.1. Klasični podtip H1N1 11
2.3.2. Podtip H1N1 nalik ptičjem virusu (engl. avian-like) 11
2.3.3. Podtip H3N2 nalik ljudskim podtipovima influence (engl. human-like) 12
2.3.4. Podtip H1N2 12
2.4. Klinička slika i patogeneza influence svinja 13
2.5. Etiologija influence 14
2.5.1. Klasifikacija virusa influence 14
2.5.2. Struktura virusa influence A 15
2.6. Replikacija virusa 19
2.7. Antigensko skretanje i antigenska izmjena 20
2.8. Uloga svinje u prijenosu virusa influence 22
2.9. Imunološki odgovor na infekciju virusom influence 22
2.10. Laboratorijska dijagnostika 23
2.10.1. Serološke metode za dokazivanje protutijela za virus influence svinja 24
2.10.2. Dokazivanje virusa influence u kliničkim uzorcima. 24
2.10.2.1. Imunohistokemijski postupak 25
2.10.2.2. Molekularne metode 25
2.10.3. Izdvajanje virusa influence A 26
2.11. Vakcinacija 27
3. OBRAZLOŽENJE TEME 28
4. MATERIJALI I METODE
4.1. Materijali 29
4.1.1. Prikupljanje, pohrana i priprema uzoraka za istraživanje 30

4.2. Metode....31
4.2.1. Dokaz protutijela serološkim metodama....31
4.2.2. Dokazivanje specifičnih protutijela postupkom inhibicije hemaglutinacije....38
4.2.3. Dokaz antigena u uzorcima tkiva pluća imunohistokemijskim postupkom....42
4.2.4. Molekularne metode....44
4.2.4.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real time PCR) za dokaz gena matrice (M) virusa influence A....46
4.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokaz gena HA virusa influence svinja....50
4.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokaz gena HA virusa influence svinja....53
4.2.5. Sekvenciranje....58
4.2.6. Računalne analize nukleotidnih sljedova....58
4.2.7. Statistička obrada podataka....59
4.2.8. Metoda izdvajanja virusa na staničnoj kulturi....60
4.2.9. Izdvajanje virusa influence svinja u kokošjim embrijima....62
5. REZULTATI
5.1. Rezultati seroloških pretraživanja....64
5.2. Patoanatomski nalaz....69
5.3. Dokaz antigena imunohistokemijskim postupkom (IHK)....72
5.4. Rezultati pretraga molekularnim metodama....73
5.5. Rezultati izdvajanja virusa influence svinja na MDCK staničnoj kulturi....85
5.6. Rezultati izdvajanja virusa influence svinja na kokošjim embrijima....86
6. RASPRAVA....89
7. ZAKLJUČCI....97
8. POPIS LITERATURE....98
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA....116

POPIS SLIKA

Slika 1. Međuvrsni prijenos virusa influence A

Slika 2. Shematski prikaz virusa influence A

Slika 3. Shematski ulaska virusa u stanicu fuzijom virusne ovojnice i stanične membrane

Slika 4. Antigensko skretanje i izmjena

Slika 5. Primjer stvaranja novog soja virusa u svinji

Slika 6. Prikupljanje ciljnih uzoraka za izravan ili neizravan dokaz virusa i dijagnozu infekcije virusom influence tipa A u svinja.

Slika 7. Primjer tehnologije promjene naboja ChargeSwitch®

Slika 8. Pročišćavanje DNA odsječaka (PCR-produkata) prema protokolu kompleta *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*

Slika 9. Cijanoza kože prasadi kao znak respiratornih bolesti

Slika 10. Patoanatomske promjene na plućima uslijed infekcije VIS-om

Slika 11. Karakterističan patoanatomski nalaz životinje inficirane VIS-om

Slika 12A. Pluća- presjek parenhima i većeg bronha. Povećanje 10x

Slika 12B. Pluća – presjek sluznice bronha. Bojanje H&E. Povećanje 40x

Slika 13. Presjek parenhima i većeg bronha, 10x

Slika 14. Tkivo pluća. Presjek sluznice bronha. 40x. IHC anti SIV H1N1/H3N2, DAB kromogen, diferencijalno bojeno Mayerovim hematoksilinom

Slika 15. Reprezentativni prikaz rezultata u vidu amplifikacijskih krivulja dobivenih lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu na uređaju Mx3005P (Stratagene)

Slike 16. i 17. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena HA u 1,5%-tnom agaroznom gelu

Slika 18. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena NA u 1,5%-tnom agaroznom gelu

Slike 19. i 20. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena NA

Slike 21. i 22. Filogenetska stabla dobivena analizom inačica odsječka gena HA

Slika 23. Filogenetsko stablo dobiveno analizom inačica odsječaka gena NA

Slika 24. A. MDCK, negativna kontrola, 10x; B. CPU, 1. dan nakon inokulacije virusa; 10x; C. CPU, 3. dan nakon inokulacije virusa; 10x

Slika 25. Provjera umnažanja virusa na MDCK stanicama metodom Real time RT-PCR za gen M VIS

POPIS TABLICA

Tablica 1. Podtipovi influence A u svinja diljem u svijeta (BROWN, 2000.)

Tablica 2. Karakteristike virusa influence A, B i C

Tablica 3. Geni i proteini virusa influence A

Tablica 4. Dostupne metode za dijagnostiku VIS A te njihova primjena

Tablica 5. Metode pretrage i broj pretraženih uzoraka svinja držanih u farmskim i obiteljskim uzgojima po županijama

Tablica 6. Inkubacije Swinecheck ® H_3N_2

Tablica 7. Sekvencije početnica i probe korišteni u protokolu prema radu Spackman i sur. (2002)

Tablica 8. Priprema PCR mješavine

Tablica 9. Temperaturni profili za uređaj LightCycler 1.5

Tablica 10. Nazivi početnica i probe te njihove koncentracije (CDC, 2009.).

Tablica 11. Priprema PCR mješavine

Tablica 12. Temperaturni profili za uređaj Stratagene Mx3005P

Tablica 13. Početnice za umnažanje odsječaka gena HA (CHIAPPONI i sur., 2012.)

Tablica 14. Početnice za umnažanje cijelog gena HA (HOFFMANN i sur., 2001.)

Tablica 15. Početnice za umnažanje odsječaka gena HA (PHIPPS i sur., 2004.)

Tablica 16 . Sastav PCR-reakcijske smjese od 25 μL.

Tablica 17. Početnice za umnažanje ciljanih odsječaka gena NA (FEREIDOUNI i sur., 2009.)

Tablica 18. Temperaturni ciklusi (FEREIDOUNI i sur., 2009.)

Tablica 19. Početnice za umnažanje ciljanih odsječaka gena NA (CHIAPPONI i sur., 2012.)

Tablica 20. Početnice za umnažanje cijelog gena NA (HOFFMANN i sur., 2001.)

Tablica 21 . Sastav PCR-reakcijske smjese volumena 25 μL.

Tablica 22. Prilagođeni temperaturni ciklusi za umnažanje cijelog gena NA

Tablica 23. Prikaz seroprevalencije za virus influence svinja te zastupljenost podtipova u farmskim uzgojima i obiteljskim gospodarstvima

Tablica 24. Seroprevalencija prema kategorijama životinja nakon pretraživanja komercijalnim ELISA testovima

Tablica 25. Broj ukupno pretraženih uzoraka seruma po kategorijama svinja metodom inhibicije hemaglutinacije i najveći titar za pojedini podtip

Tablica 26. Zastupljenost pozitivnih uzoraka seruma na podtipove VIS pretraženih metodom IHA (%) po kategorijama životinja
Tablica 27. Prikaz izračunatih donjih i gornjih granica prevalencije sa 95%-tnim intervalom pouzdanosti (IP).
Tablica 28. 95%-tni interval pouzdanosti za rezultate dobivene komercijalnim ELISA testovima
Tablica 29. Broj ukupno pretraženih uzoraka nazofaringealnih obrisaka i broj uzoraka u kojima je dokazan gen M virusa influence svinja po županijama
Tablica 30. Broj ukupno pretraženih uzoraka pluća i broj uzoraka u kojima je dokazan gen M virusa influence svinja po županijama
Tablica 31. Referentni izolati uključeni u filogenetičku analizu umnoženih odsječaka gena HA i NA VIS

POPIS KRATICA

Ag = antigen

Ab = antibody; protutijelo

AGID = Agar Gel Immunodiffusion; gel difuzijska precipitacija

ATB = antibiotik

BAL = bronchoalveolar lavage; bronhoalveolarni ispirak

BHQ1 = Blackhole Quencher 1

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

bp = base pair; par baza

BSA = Bovine Serum Albumin; goveđi serumski albumin

CD = Cluster of Differentiation; stanični diferencijacijski (antigeni)

CDC = Center for Disease Control

cDNA = Complementary Deoxyribonucleic Acid; komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

CI = Confidence Interval; interval povjerenja

CPU = citopatogeni učinak

Ct = Threshold cycle; granični ciklus

DAB = 3,3'- diaminobenzidin

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium; Dulbeccov modificirani Eagle medij

DNA = Deoxyribonucleic Acid; deoksiribonukleinska kiselina

DPX = Distyrene Plasticizer Xylene

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid; etilendiamintetraoctena kiselina

ELISA = Enzyme-linked imunosorbent assay; imunoenzimni test

ESNIP = European Surveillance Network for Influenza in Pigs

FAM = Fluorescein amidite

FBS = Foetal bovine serum; goveđi fetalni serum

HRPO = Horseradish peroxidase; peroksidaza iz hrena

HVI = Hrvatski veterinarski institut

IFA = Indirect fluorescent antibody

IFN = interferon

Ig = imunoglobulin

IHA = inhibicija hemaglutinacije

IHC = Immunohistochemistry; imunohistokemija (IHK)

IL = interleukin

IP = interval povjerenja

IS = influenca svinja

MDCK = Madin–Darby Canine Kidney

MEGA = Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mRNA = Messenger RNA; vjesnička RNA

NP At = nukleoproteinska protutijela

nt = nukleotid

OD = Optical density; optička gustoća

OIE = Office International des Epizooties; Međunarodni ured za zdravlje životinja

PBS = Phosphate Buffer Saline; puferirana otopina soli fosfata

PCR = Polymerase Chain Reaction; lančana reakcija polimerazom

PCV2 = Porcine circovirus type 2; svinjski cirkovirus tip 2

pdm = pandemijski

PRCV = Porcine respiratory coronavirus; svinjski respiratorni koronavirus

PRRSV = Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,

RDE = Receptor destroying enzyme, enzim koji uklanja receptore

Real time RT-PCR = lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja

RNA = Ribonucleic Acid; ribonukleinska kiselina

RNaza = ribonukleaza

RPE puffer = blagi pufer za ispiranje, dio RNeasy kompleta (Qiagen)

RT-PCR Reverse Transcription-PCR = lančana reakcija polimerazom nakon obratnog prepisivanja

SIV = swine influenza virus; virus influence svinja

TBE = Tris-borat-EDTA

TMB = 3,3’,5,5’- Tetramethylbenzidine

TNF-α = Tumor necrosis factor alpha; čimbenik tumorske nekroze alfa

TRA = triple reassortant, trostruka presloženica

VI = virus influence

VIS = virus influence svinja

VNT = virus-neutralizacijski test

vRNA = virusna ribonukleinska kiselina

WHO = World Health Organization, Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

Virus influence svinja (VIS, engl. swine influenza virus, SIV) smatra se jednim od najznačajnih primarnih patogena respiratornih bolesti svinja. Bolest je proširena po cijelom svijetu i uzročnik je značajnih gospodarskih šteta u svinjogojstvu. U svinja najčešće kruže podtipovi virusa influence A H1N1, H1N2 i H3N2 (OLSEN i sur., 2006.). Podtipovi virusa influence A H1N1 i H3N2 su različita podrijetla, odnosno različite genske i antigenske strukture, a sojevi podtipa H1N2 su zapravo genske presloženice spomenutih podtipova. Svinje imaju presudnu posredničku ulogu u međuvrsnom prijenosu virusa influence. Važno je istaknuti da svinja posjeduje receptore za ptičje viruse i humane viruse influence, a pri istodobnoj infekciji dolazi do preslagivanja virusa influence i do promjene njihove receptorske specifičnosti (BROWN, 2000.). Stoga se smatra da svinje predstavljaju idealan medij za umnožavanje različitih virusa influence i nastanak novih virusnih presloženica koje mogu probiti barijeru vrste, ponekad s nepredvidivim posljedicama (GARTEN i sur., 2009.). Filogenetske analize pokazale su da su linije virusa influence svinja i čovjeka usko srodne i da potječu od zajedničkog pretka virusa influence ptica.

U novije doba, naročito posljednjih 10-tak godina, došlo je do temeljitih promjena u pristupu pojavi influence u populaciji životinja s naglaskom na ptičju i svinjsku influencu. Osim gospodarskih gubitaka, influenca predstavlja i javnozdravstveni problem, odnosno potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje (CAPUA i MUNOZ, 2013.). Sposobnost virusa influence svinja da se prilagodi novom domaćinu, uključujući i čovjeka, ukazuje da ima zoonotski potencijal. Stoga ova bolest sve više postaje od naročita značenja za javno zdravstvo što iziskuje potrebu za boljim razumijevanjem njezine epidemiologije (KAPLAN i sur., 2015.).

Iako je do danas utvrđena visoka serološka prevalencija virusa influence u domaćih i divljih svinja i dokazana prisutnost virusnih gena diljem svijeta, u Republici Hrvatskoj dosada nisu provedena slična istraživanja. Napravljene su samo temeljne studije o seroprevalenciji koje su se zasnivale na primjeni komercijalnih imunoenzimnih testova i inhibiciji hemaglutinacije za dokaz protutijela za virus influence u domaćih i divljih svinja, dok izdvajanje virusa i identifikacija uzročnika nikad nije provedena.

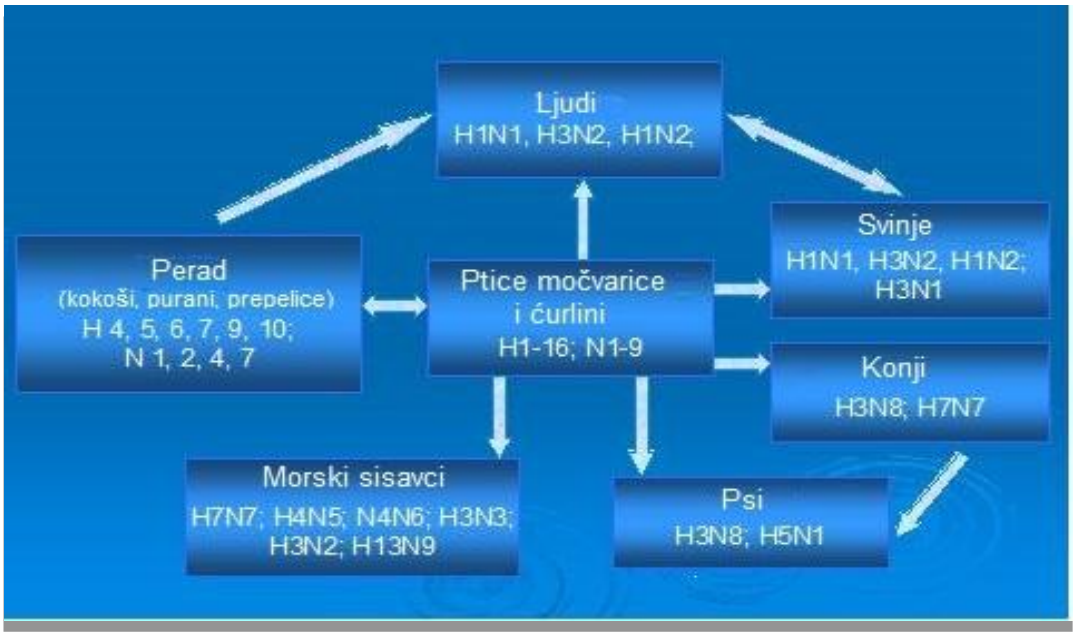
Cilj je ovog rada istražiti pojavnost i rasprostranjenost virusa influence svinja u populaciji domaćih svinja u Republici Hrvatskoj te prikazati rezultate pretraživanja i upotpuniti spoznaju o proširenosti ove bolesti u nas. Stoga su u ovom radu pretraživani uzorci krvnog seruma, nosnih obrisaka i organa podrijetlom od domaćih svinja držanih na velikim farmama i pojedinim malim

dvorišnim uzgojima. Uzorci seruma svinja pretraživani su na nazočnost protutijela za virus influence komercijalnim imunoenzimnim testovima (ELISA) te metodom inhibicije hemaglutinacije u svrhu određivanja podtipova VIS. Za dokaz prisutnosti genoma VIS u uzorcima nosnih obrisaka i/ili pluća primijenjene su metode RT-PCR i Real-Time PCR, a u svrhu izrade filogenetske analize postupak sekvenciranja amplifikacijskih produkata. Za dokaz virusa IS u plućima rabljena je imunohistokemija (IHC). Rezultati proizašli iz ovog istraživanja omogućuju uvid u stvarnu ulogu svinja kao potencijalnih rezervoara virusa influence i medija za preslagivanje virusnih gena pri istodobnoj infekciji dvama ili više različitih podtipovima podrijetlom od virusa influence ptica, svinja i ljudi.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Povijest influence svinja

Influenca svinja (IS) je akutna, izrazito kontagiozna virusna zarazna bolest koja se očituje dišnim poremećajima, a uzročnik joj je virus influence tipa A. Bolest nastupa naglo, uz izraženi kašalj, dispneju i vrućicu nakon koje uglavnom dolazi do brzog ozdravljenja. Rijetko nastupa uginuće. Bolest je prvi put dokazana 1918. u Sjevernoj Americi, Mađarskoj i Kini (CHUN, 1919.; KOEN, 1919.; BEVERIDGE, 1977.) u uzgojima svinja kao bolest slična pandemiji influence u ljudskoj populaciji poznatoj pod nazivom „španjolska gripa“ koja je 1918. godine odnijela preko 20 milijuna ljudskih života. Već tada je uočena sličnost između bolesti u svinja i ljudi i bilo je jasno da podrijetlo virusa influence valja tražiti u životinjskom svijetu (slika 1). Kasnije, retrogradnim pretraživanjem, potvrđeno je da je bolest u oba slučaja uzrokovana srodnim virusima influence tipa A. Virus je označen kao podtip A H1N1, a filogenetska analiza pokazala je da su linije virusa influence svinja i čovjeka usko srodne i da potječu od zajedničkog pretka (GORMAN i sur., 1992.; KANEGAE i sur., 1994.; REID i sur., 1999.). Prvi virus influence izdvojen je iz svinja 1930. godine (SHOPE, 1931.; SHOPE, 1931a.; SHOPE, 1931b.; SHOPE, 1964.).



Slika 1. Međuvrsni prijenos virusa influence tipa A

Izvor: preuzeto s mrežne stranice: http://www.infections.net.au/influenza.htmL#17

2.1.1. Evolucija virusa influence tipa A

Gledajući kroz povijest, epidemiologija virusa influence u populaciji svinja je jedinstvena. Jasno se može razlikovati sojeve izdvojene iz svinja od srodnih sojeva u drugih domaćina, uključujući čovjeka. Postoji periodična izmjena virusa ili virusnih gena između različitih domaćina putem međuvrsnog prijenosa i/ili genskog preslagivanja. Filogenetske analize pokazale su da su linije virusa influence svinja i čovjeka usko srodne i da potječu od zajedničkog pretka virusa influence ptica. Stekle su sposobnost da inficiraju i prenose se individualno među svinjama te tako perzistiraju u populaciji svinja. Sojevi dobrom prilagodbom imaju sposobnost da se istodobno javljaju enzootski. Također, nije neuobičajeno da više podtipova virusa istodobno kruži u populaciji što rezultira većom mogućnošću preslagivanja gena i tvorbom novih sojeva koji imaju mogućnost širenja među svinjama (BROWN, 2013.). Povremeno, takvi virusi mogu još jednom prijeći barijeru vrste i prenijeti se na drugog domaćina (OLSEN i sur., 2006.). Posljedica takvih događanja vodi do neovisne evolucije virusa influence svinja (VIS), posebno na razini kontinenata pa se mogu uočiti jasne razlike u virusima na određenom kontinentu (BROWN, 2013.).

2.2. Pregled rasprostranjenosti influence svinja

U populaciji svinja diljem svijeta kolaju tri glavna podtipa virusa influence svinja: H1N1, H3N2 te H1N2. Virusi inficiraju svinje enzootski i odgovorni su za pojavu jedne od najproširenijih dišnih bolesti svinja (tablica 1).

Nakon izvješća o prvoj pojavi influence svinja, u vrijeme pandemije 1918. godine, bolest je dugo bila ograničena na sjever američkog kontinenta gdje se sporadično javljala u zimskim mjesecima. Do 1975. godine vrlo malo izvješća ukazuje na prisutnost virusa IS izvan sjevernoameričkog kontinenta. Potom je klasični virus influence svinja, ili nalaz protutijela, dokazan u velikom broju ostalih zemalja kao što su Kanada (MORIN i sur., 1981.), Brazil (CUNHA i sur., 1978.), Japan (YAMANE i sur., 1978.), Indija (DAS i sur., 1981.), Kina i Tajvan (SHORTRIDGE i WEBSTER, 1979.). U Europi je virus IS zabilježen u Velikoj Britaniji (BLAKEMORE i GLEDHILL, 1941a.), Čehoslovačkoj (HARNACH i sur., 1950.) i zapadnoj Njemačkoj (KAPLAN i PAYNE, 1959.). Nakon tog vremena bolest je gotovo iščeznula i u Europi nije bilo dokaza njezine pojave gotovo 20 godina, sve do 1976. Zatim je dokazana u Italiji, a izdvojen je virus čija su svojstva bila usko srodna s klasičnim virusom influence u

Americi (NARDELLI i sur., 1978.) te se pretpostavlja da je virus u uzgoje unešen uvozom svinja iz SAD-a. Od 1979. godine, epizootije uzrokovane podtipom H1N1 učestale su u Belgiji i Francuskoj (VANDEPUTTE i sur., 1980.; OTTIS i sur., 1981.; SOERENSEN i sur., 1981.; GOURREAU i sur., 1983.; MARTINSSON i sur., 1983.; MASUREL i sur., 1983.; SINNECKER i sur., 1983.)

Tablica 1. Podtipovi virusa influence A koji inficiraju svinje u svijetu (BROWN, 2000.)

Podtip	Kontinent	Antigenska obilježja
H1N1	Sjeverna Amerika Europa Azija Južna Amerika	„Klasični“ virus, izdvojen 1930. u Sj. Americi
	Europa	Virus nalik ptičjem (engl. avian-like), izdvojen 1979.
	Azija	Virus nalik ptičjem (engl. avian-like), izdvojen 1993.
H3N2	Azija Europa Sjeverna Amerika Južna Amerika Afrika	Virus nalik ljudskom (engl. human-like), izdvojen 1970. u Aziji
	Azija	Virus nalik ptičjem (engl. avian-like), izdvojen 1978.
H1N2	Azija	Presloženica „klasičnog“ i virusa nalik ljudskom, Japan
	Europa	Presloženica ljudskog virusa nalik ljudskom, Velika Britanija

Analiza izdvojenih virusa pokazala je da u svinja u Europi prevladava podtip H1N1 nalik ptičjem (engl. avian-like) koji se antigenski i genski razlikuje od sjevernoameričkog klasičnog H1N1 virusa influence svinja, a hemaglutinini su bili sličniji ptičjem H1 što je upućivalo na prijenos virusa s ptica (pataka) na svinje (PENSAERT i sur., 1981.). Virus podrijetlom od ptica činio se invazivnijim od klasičnog svinjskog virusa influence koji je kružio u SAD-u. Nešto drugačija situacija bila je na britanskom otočju gdje su usporedno kružili i klasični i ptičji H1N1 (BROWN i sur., 1995b.).

Od 1984. godine kada je došlo do pojave IS uzrokovane podtipom H3N2 nalik ljudskom (engl. human-like) bolest je istraživana diljem Europe (HAESEBROUCK i sur., 1985.). Zabilježena visoka seroprevalencija uzrokovana podtipom H3N2 (ROBERTS i sur., 1987.), bila je u suprotnosti od niske prevalencije u Sjevernoj Americi gdje se bolest javljala samo sporadično i to od zaraženih ljudi (EASTERDAY, 1980.).

Tijekom 1980-tih u Japanu je utvrđen porast prevalencije podtipovima H3N2 i H1N1 u svinja što je dovelo do pojave mješovitih infekcija. Preslagivanjem gena između klasičnog svinjskog H1N1 podtipa i humanog H3N2 virusa nastao je podtip H1N2 koji je dokazan u svinja u Japanu, a nakon toga sporadično se počeo javljati i u ostalim dijelovima svijeta (NEROME i sur., 1982.). Podtip H1N2 pojavio se u svinja u Velikoj Britaniji i ostao prisutan u obliku endemije (BROWN i sur., 1995a.).

Dosadašnja serološka istraživanja upućuju na to da je u velikim uzgojima svinja veća raznolikost protutijela utvrđenih za jedan ili više podtipova virusa. U područjima s manjim uzgojima seroprevalencija je značajno manja i uglavnom je posljedica izloženosti podtipu H1N1 virusa nalik ptičjem, te jako niskom prevalencijom na podtipove H1N2 i H3N2 (BROWN, 2013.).

2.2.1. Pregled dosadašnjih istraživanja u Europi

Tijekom 2002. i 2003. godine, u više zemalja zapadne Europe (Belgiji, Češkoj, Njemačkoj, Italiji, Irskoj, Poljskoj i Španjolskoj) provedena su opsežna serološka istraživanja. Ukupno je prikupljeno 4190 uzoraka seruma krmača podrijetlom sa 651 farme. Uzorci su pretraženi metodom inhibicije hemaglutinacije za podtipove virusa H1N1, H3N2 i H1N2.

U Belgiji, Njemačkoj, Italiji i Španjolskoj seroprevalencija za sva tri podtipa virusa influence bila je visoka (≥30% seropozitivnih krmača) do vrlo visoka (≥50%). Nešto niže vrijednosti seroprevalencije utvrđene su za podtip H1N2 u Italiji (13,8%). U većini krmača u zemljama s velikim uzgojima svinja dokazana su protutijela za dva ili sva tri podtipa. U Irskoj, Češkoj i Poljskoj, gdje se uglavnom održavaju manji farmski uzgoji, H1N1 je dominantan podtip (8,0-11,7% serološki pozitivnih) dok je broj serološki pozitivnih krmača na podtipove H1N2 i H3N2 bio znatno niži (0-4,2%) (VAN REETH i sur., 2008.).

Posljednje veće istraživanje provedeno u Europi bilo je u razdoblju od 2010. do 2013. godine u sklopu European Surveillance Network for Influenza in Pigs (ESNIP 3). Proveden je pasivni monitoring u 16 zemalja (Velika Britanija, Francuska, Nizozemska, Finska, Njemačka, Španjolska, Poljska, Italija, Belgija, Mađarska, Slovačka, Litva, Bjelorusija, Rusija, Grčka i Danska) temeljen na prijavi akutnih kliničkih znakova respiratornih bolesti u svinja, a jedina zemLja u kojoj se provodio aktivni monitoring bio je Izrael. U razdoblju od studenoga 2010. do listopada 2013. pretraženo je 9025 uzgoja svinja te se svako stado smatralo pozitivnim na virus influence ako je u njemu postojala barem jedna pozitivna životinja. Utvrđena je prisutnost virusa

influence A u 31% uzgoja (2759 od ukupno 9025), no učestalost pozitivnih uzoraka jako se mijenjala s obzirom na zemlju podrijetla te je iznosila od 3% do 67%. Karakterizacijom 1887 izolata virusa influence podrijetlom iz 14 različitih zemalja određen je H i N podtip izravno iz biološkog materijala ili nakon izolacije virusa. Slično rezultatima prethodnog istraživanja u sklopu programa ESNIP 1 i ESNIP 2 tijekom 2000. i 2008. godine podtipovi virusa koji prevladavaju u svinja u Europi bili su virusi nalik ptičjem virusu H1N1 (engl. avian-like swine $H1_{av}N1$) u 53,6% uzgoja, H1N2 (13%) i H3N2 (9,1%) nastali preslagivanjem gena ljudskih i svinjskih virusa (engl. human-like reassortant swine H1N2 and H3N2) te pandemijski A/H1N1 2009 (H1N1 pdm) podtip u 10,3% svinja. U većini europskih zemalja u razdoblju od 2010. do 2013. zabilježena je povećana učestalost pandemijskog podtipa H1N1 (SIMON i sur., 2014.).

Današnji svinjski virus influence A H3N2 u europskim uzgojima svinja podrijetlom je od ranih pandemijskih sojeva humane influence A H3N2, ali se po svojim genetskim i antigenskim osobinama znatno razlikuje od suvremenih ljudskih virusa influence.

2.2.2. Pregled istraživanja u Americi i Aziji

Influenca svinja pojavila se u SAD-u netom nakon pojave jedne od najozbiljnijih pandemija influence u ljudi 1918. godine. Već tada se sumnjalo da se pojava influence u ljudi ispreplićе s pojavom influence u nekih vrsta životinja i da podrijetlo virusa valja tražiti u životinjskom svijetu. Vjerovalo se da je uzrokovana prilagodbom ljudskog virusa influence u svinjama. Sekvenciranje gena koji kodiraju unutarnje virusne proteine ukazivalo je na to da ljudski pandemijski H1N1 soj i klasični svinjski H1N1 soj imaju zajedničkog ptičjeg pretka. Ovi podatci upućuju na to da je virulentni ptičji H1N1 soj zarazio ljudsku populaciju 1918. te uzrokovao pandemiju. Smatra se da se većina pandemija influenca A u ljudi proširila iz ruralnih sredina Dalekog istoka (Kina), gdje ljudi drže svinje i patke u neposrednoj blizini. Nakon toga je pandemijski virus uveden u populaciju svinja u kojoj je perzistirao nepromijenjen.

Dominantni soj VIS koji je kružio u SAD-u od 1930. do 1990-tih bio je H1N1 (OLSEN i sur., 2000.). Iako je bio relativno očuvan, povremeno su se javljale antigenske i genske promjene (REKIK i sur., 1994.).

Kombinacije gena ljudskih i klasičnih virusnih sojeva dokazane su u svinja u Aziji i SAD-u (ZHOU i sur., 1999.). H3N2 podtipovi s HA i NA genima ljudskih virusa i genima za unutarnje proteine podrijetlom od ptičjih virusa izdvojeni su iz svinja u Aziji. H3N2 utvrđen je i u Koreji.

Podtip H3N2 javlja se enzootski u svinja u južnoj Kini te postoji opasnost od preslagivanja s ptičjim podtipom H5N1 koji se tamo javlja također enzootski (PEIRIS i sur., 2001.).

Od 1998. dvostruko i trostruko presloženi virusi izdvojeni su iz svinja u SAD-u. Izolati izdvojeni u Sjevernoj Karolini imali su tri gena podrijetlom od ljudskog virusa i pet gena podrijetlom od svinjskog virusa (ZHOU i sur., 2000.). Od ljudskog virusa bili su geni HA i NA, četiri gena bila su od svinjskog H1N1 virusa te preostala dva gena podrijetlom od ptičjih virusa (ZHOU i sur., 1999.; WEBBY i sur., 2000.; KARASIN i sur., 2000c.)

Ubrzo nakon pojave podtipa H3N2 u SAD-u se pojavio novi podtip H1N2 u kojem je ljudski H3 ljudskog virusa zamijenjen s H1 svinjskog virusa te se proširio dalje u svijetu (CHOI i sur., 2002.; KARASIN i sur., 2002.).

Prvi neobičan podtip virusa influence pojavio se u jugoistočnoj Aziji. Radilo se o podtipu H9N2 uvedenom u uzgoj svinja vjerojatno podrijetlom od kopnene peradi (KATSUDA i sur., 1995.). Daljnji problem pojavio se u jesen 1999. kada je virus podtipa H4N6 utvrđen u svinja s upalom pluća na komercijalnoj farmi svinja u Kanadi (KARASIN i sur., 2000a.). Pojavio se i ptičji H5N1 u svinja u Kini te je prenesen zapadno u Rusiju. Mogućnost širenja i perzistiranja navedenih ptičjih virusa u populaciji svinja je još uvijek nepoznata. Iako nije došlo do replikacije, ovi virusi mogu imati važnu ulogu u preslagivanju virusnih gena u svinja te se radi toga provodi stalni nadzor nad virusom influence svinja. Navedeno je prvi primjer međuvrsnog prijenosa ptičjeg H4 virusa na domaće svinje u prirodnim uvjetima. Važno je napomenuti da je cijeli ptičji virus bio iz sjevernoameričke linije.

„Trostruko presloženi“ (engl. triple reassortant-TRA) virusi influence A svinja (H1) sadrže gene ptičjih, ljudskih i svinjskih virusa influence. Do danas trostruko presloženi virusi koji se javljaju u Sjevernoj Americi (uključujući virus influence A H3N2 u Aziji) nisu utvrđeni u Europi (ECDC, 2014.).

2.2.3. Istraživanja influence svinja provedena u Hrvatskoj

Do danas je na području Hrvatske provedeno svega nekoliko studija o prisutnosti virusa influence svinja. U visokom postotku dokazana su protutijela za podtipove H1N1 i H3N2 virusa influence u domaćih i divljih svinja.

U istraživanju provedenom u populaciji divljih svinja na području Sisačko-moslavačke županije, dokazana je prisutnost protutijela za virus IS (ŽUPANČIĆ i sur., 2000.). Uzorci su pretraživani

metodom inhibicije hemaglutinacije, a korišteni su referentni sojevi virusa (World Health Organization Collaborating Center for Influenza, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA), odnosno humanog virusa influence tip A, podtipovi H1N1 (A/Johanesburg/82/96), H3N2 (A/Nanchang/933/95 i A/Wuhan/359/95) te virus influence tip B/Beijing/184/93-like, a pozitivnim se smatrao titar protutijela ≥1:20. U razdoblju od 1999. do 2000. godine prikupljeno je 17 uzoraka krvi podrijetlom od nerastova, 6 uzoraka od krmača i 78 uzoraka krvi prasadi. Od ukupno 101 pretraženog uzorka krvnog seruma 18,81 % polučilo je pozitivan rezultat na virus influence tip A H1N1, 87,12% na podtipove H3N2 i 67,32% na virus influence tip B (ŽUPANČIĆ i sur., 2000).

Tijekom dvije lovne sezone, u periodu od 2005.-2006. godine (*n*=359) te 2009.-2010. godine (*n*=197) provedeno je pretraživanje uzoraka krvnog seruma divljih svinja u 4 hrvatske županije: Osječko-baranjska, Virovitičko-podravska, Požeško-slavonska i Sisačko-moslavačka (ROIĆ i sur., 2012.). Uzorci su pretraživani komercijalno dostupnim kompletom za dokazivanje protutijela za virus influence tip A podtip H1N1. Seroprevalencija u svim pretraživanim županijama u razdoblju od 2005. do 2006. godine iznosila je 8,6 %, a u razdoblju od 2009. do 2010. godine 11,7 %. Zanimljivo je da je statistički značajan porast pozitivnih uzoraka seruma bio zabilježen u Sisačko-moslavačkoj županiji kada je tijekom istraživanja u 2005./2006. godini serološka prevalancija iznosila 12.4 % da bi u 2009./2010. došlo do povećanja od 30.2 %.

Dokaz protutijela za virus influence A podtip H1N1 u domaćih svinja opisuju (ROIĆ i sur., 2010.), Ukupno su bila pretražena 263 uzorka seruma rasplodnih životinja s velikih farmi i 184 uzorka seruma s malih privatnih domaćinstava (90 krmača i 94 tovljenika). Uzorci su pretraživani primjenom komercijalnih imunoenzimnih kompleta (HerdCHECK SIV Antibody Test Kit H1N1, IDEXX Laboratories, Maine, USA). Uzorci podrijetlom od rasplodnih svinja bili su negativni na prisutnost protutijela za virus influence A, podtip H1N1. Međutim, prisutnost protutijela za podtip H1N1 utvrđena je u 17 svinja s privatnih domaćinstava (9,23 %), s time da je seroprevalencija u krmača iznosila 5,55 %, a u tovljenika 11,28 %. Kao zaključak nameće se činjenica da uvjeti držanja životinja uvelike pridonose izloženosti i prijenosu virusa influence u domaćinstvima te da bi se ubuduće trebao provoditi program monitoringa.

Također, (ROIĆ i sur., 2011.) pretražili su ukupno 415 uzoraka krvnih seruma podrijetlom od necijepljenih svinja različite dobi s 12 velikih farmi, u istočnom dijelu Hrvatske, s visokim biosigurnosnim uvjetima. Uzorci krvnog seruma pretraženi su na prisutnost protutijela za

podtipove H1N1 i H3N2 komercijalnim ELISA testovima (HerdCHECK SIV Antibody Test Kit H1N1 i H3N2, IDEXX Laboratories, Maine, USA). Od ukupnog broja pretraženih životinja 14,2 % bilo je pozitivno na protutijela za podtip H1N1 te 6,5 % za podtip H3N2. Najviša seroprevalencija utvrđena je u skupini krmača i nazimica (9,3-50,0 %) u odnosu na skupinu odbite prasadi i tovljenika u kojih je seroprevalencija iznosila 2,5-8,6%. Rezultati ove studije ukazuju da podtipovi virusa influence H1N1 i H3N2 kruže u komercijalnim uzgojima svinja u istočnom dijelu Hrvatske te da dominira podtip H1N1. Dobiveni rezultati pokazuju da zaraženost ovisi o dobi životinje budući da su protutijela u krmača i nazimica utvrđena u većem postotku. Takva seroprevalencija mogla bi se objasniti činjenicom da krmače predstavljaju rezervoar virusa jer obitavaju na farmi duži vremenski period od tovljenika. Time postoji veća mogućnost da su tijekom života u jednoj fazi bile izložene infekciji virusom influence od drugih svinja ili čak ljudi.

2.3. Podtipovi virusa influence A u svinja i pregled pojavnosti

Novi podtipovi i inačice virusa influence koji nastaju na jednom kontinentu, brzo se prenose i na ostale kontinente gdje dovode do pojave epidemija.

Segmentirana građa virusnog genoma je kritično strukturno svojstvo koje omogućava preslagivanje gena. Od 1998. godine, geni HA, NA i PB1 podrijetlom od ljudskih podtipova, geni M, NS i NP podrijetlom od klasičnih svinjskih podtipova i geni PA i PB2 podrijetlom od ptičjih podtipova utvrđeni su u virusima influence svinja (OLSEN, i sur., 2000.; KARASIN i sur., 2000b.).

Virusi influence tipa A izdvojeni u Europi imaju neka zajednička svojstva sa srodnim sojevima iz Sjeverne Amerike i Azije, ali istovremeno posjeduju i brojne značajne različitosti. Epizootiologija influence svinja u Europi povijesno je drugačija od one u drugim dijelovima svijeta te su tako i različiti pristupi načinu kontrole te bolesti (BROWN, 2013.)

Podtipovi virusa influence A najčešće izdvojeni iz svinja su klasični H1N1, zatim H1N1 i H3N2 nalik ptičjim podtipovima (engl. avian-like), H3N2 nalik ljudskim podtipovima (engl. human-like) te u novije vrijeme podtip H1N2 koji je uglavnom nastao preslagivanjem gena HA i gena NA ljudskih podtipova i VIS-a (MAROZIN i sur., 2002.). Navedeni podtipovi pripadaju virusu influence svinja, odnosno prilagođeni su svojim domaćinima i antigenski se razlikuju od humanih virusa influence iako im je nazivlje isto.

Pojava i prevalencija VIS mijenja se u različitim područjima Europe, ali se čini da podtip H1N1 ptičjeg podrijetla prevladava, slijedi ga presloženi H3N2 dok je najmanja pojavnost podtipa H1N2.

2.3.1. Klasični podtip H1N1

Klasični H1N1 virusi prvi put su uočeni 1918. godine u Sjedinjenim Američkim Državama, a nastali su od pretka soja koji je odgovoran za pandemiju influence u ljudi u to vrijeme i koji se proširio u cijelom svijetu.VIS je u Europi prvi put izdvojen u Velikoj Britaniji između 1938. i 1940. godine (LAMONT, 1938.; BLAKEMORE, 1941b.). Analizom nukleotidnih sekvenci utvrđeno je da je svih osam genskih segmenata tog soja u bližem srodstvu s ranim ljudskim H1N1 sojem (A/Wisconsin/33 i A/Puerto Rico/8/34) nego s klasičnim svinjskim H1N1 sojem (A/Sw/Iowa/1930), kojeg je 1930. izdvojio Shope u SAD-u (NEUMEIER i sur., 1994.). Tijekom 1950. godine u Čehoslovačkoj je izoliran klasični svinjski H1N1 virus ali nakon toga nije prijavljen nijedan slučaj izolacije VIS u Europi više od dva desetljeća (DUNHAM i sur., 2009.).Klasični svinjski H1N1 podtip koji je kružio u Sjevernoj Americi nije bio prisutan u Europi sve do 1976. kada je izdvojen iz svinja uvezenih u Italiju iz SAD-a (NARDELLI i sur., 1978.). Nakon toga, H1N1 se proširio te je utvrđen u drugim europskim zemljama, na primjer u Nizozemskoj (MASUREL i sur., 1983.), Danskoj (SORENSEN i sur., 1981.), južnoj Švedskoj 1983. (ABUSUGRA i sur., 1987.) i u Velikoj Britaniji (ROBERTS i sur., 1987.). Ranih 1980-tih godina H1N1 zamijenjen je podtipom virusa influence ptičjeg podrijetla koji je zahvatio populaciju svinja. Ti virusi, nalik ptičjim virusima, prilagodili su se i izuzetno se lako prenose i održavaju unutar populacije svinja te često uzrokuju značajne zdravstvene probleme (PENSAERT i sur. 1981; BROWN, 2000.).

U Sjevernoj Americi i Aziji klasični svinjski H1N1 se još uvijek najčešće izdvaja(GUAN i sur., 1996.), no u Europi u svinja dominira H1N1 podrijetlom od ptica HINSHAW i sur., 1978.).

2.3.2. Podtip H1N1 nalik ptičjem virusu (engl. avian-like)

Sojevi virusa influence svinja podtipa H1N1 koji dominiraju u Europi u potpunosti su podrijetlom od ptica, a prenijeti su u populaciju svinja od divljih pataka tijekom 1979. godine (PENSAERT i sur., 1981.; CAMPITELLI i sur., 1997.). Nazvani su svinjskim podtipovima

H1N1 nalik ptičjim virusima i antigenski se razlikuju od klasičnih svinjskih sojeva H1N1 te su ih „zamijenili“ u Europi (CAMPITELLI i sur., 1997.; BROWN, 2000.).

2.3.3. Podtip H3N2 nalik ljudskim podtipovima influence (engl. human-like)

Ranih 1970-tih godina, podtip H3N2 nalik podtipu H3N2 koji je bio odgovoran za hongkongšku pandemiju u ljudi iz 1968. godine, pojavio se u europskoj populaciji svinja (HARKNESS i sur., 1972.). Neobičan događaj uslijedio je 1984. godine kada se kao posljedica preslagivanja gena pojavio novi soj virusa s površinskim genima (HA, NA) podrijetlom od svinjskog virusa H3N2 nalik humanom (hongkongški virus iz 1968.) te unutarnjim genima podrijetlom od H1N1 virusa nalik ptičjem. Taj „novi“ soj virusa zamijenio je dotadašnji „originalni“ svinjski H3N2 nalik humanom virusu iz 1968. godine u kruženju u populaciji svinja u europskim zemljama tijekom 1990-tih (KUNTZ-SIMON i MADEC, 2009.).

2.3.4. Podtip H1N2

U Francuskoj je 1987. godine prijavljen prvi europski slučaj pojave VIS podtip H1N2 koji je nastao kao rezultat daljnjih preslagivanja gena (GOURREAU i sur., 1994.). Taj podtip virusa nastao je preslagivanjem gena između podtipova svinjskog H1N1 virusa podrijetlom od ptica (gen HA) i presloženog europskog svinjskog H3N2 podrijetlom od ljudi (gen NA). Prvi takav virus nije se znatno proširio u populaciji svinja u Europi. Međutim drugi posve različit soj H1N2 proširio se u europskih svinja kao presloženica podtipa H1N2 nalik ljudskom podtipu koji je identificiran u Velikoj Britaniji 1994. Taj podtip proširio se po europskim zemLjama tijekom sljedećih nekoliko godina i postao endemičan (BROWN i sur., 1995a.; VAN REETH i sur., 2000.; MAROZIN i sur., 2002.). Navedeni podtip virusa bio je rezultat preslagivanja između ljudskog podtipa H1N1 iz 1980-tih (gen HA), svinjskog H3N2 nalik ljudskom (gen NA) i svinjskog H1N1 nalik ptičjem virusu od kojeg je preuzeo unutarnje gene (BROWN i sur., 1998.). Također su, genski i antigenski bili različiti od podtipova virusa koji su se pojavili 1997. godine u Francuskoj.

Nakon što je pandemijski H1N1 virus zahvatio europsku populaciju svinja, pojavili su se novi presloženi podtipovi H1N2 u Švedskoj, Italiji, Velikoj Britaniji i Njemačkoj (HOWARD i sur., 2011.; MORENO i sur., 2011.; LANGE i sur., 2013.; METREVELI i sur., 2014.).

2.4. Klinička slika i patogeneza influence svinja

Influenca svinja (IS) je akutna respiratorna bolest svinja, proširena u svjetskim razmjerima, koja može nanijeti velike gospodarske štete i učiniti proizvodnju neisplativom. Bolest nastupa naglo, morbiditet u inficiranom stadu je visok i obole gotovo sve svinje u zaraženom stadu (CVETNIĆ, 2005.).Virusi IS mogu kružiti među svinjama tijekom čitave godine, ali očitovanje infekcije se uobičajeno dešava u hladnijim mjesecima (kasne jeseni i zime), a ponekad i uvođenjem novih životinja u zaražena stada.

Tipična klinička slika bolesti opisana je još 1920-tih (SHOPE, 1964.). Nakon inkubacije koja obično traje od 1 do 7 dana (najčešće 1-3) dolazi do pojave groznice i temperature do 41,5°C. Zbog odbijanja hrane javlja se opća slabost, životinje kišu, kašlju, otežano dišu i imaju iscjedak iz nosa. Konjunktive su im zažarene i otečene. Ponekad je izraženo disanje na otvorena usta, pogotovo kad ih se potjera na kretanje. Zbog ukočenosti i bolnosti u mišićju, svinje pretežno leže. Obole obično sve životinje na farmi i sve dobne kategorije, ali su uginuća rijetka (do 1%). Znakovi bolesti naglo prestaju nakon 4 do 6 dana. Uz vidljivu kliničku manifestaciju događa se i supklinička infekcija (EASTERDAY i VAN REETH, 1999.). Bolest je teže naravi ako se javlja istodobno s drugim virusnim infekcijama poput respiratornog koronavirusa (engl. porcine respiratory coronavirus - PRCV), virusa reprodukcijskog i respiratornog sindroma (engl. porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), infekcije cirkovirusom tip 2 (engl. porcine circovirus type 2 - PCV2) te ostalim uzročnicima sekundarnih infekcija poput bakterija *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Heamophilus parasuis* i *Streptococcus suis* tip 2 (VAN REETH i PENSAERT, 1994a.; VAN REETH i PENSAERT, 1994b.; VAN REETH i sur., 1996.; EASTERDAY i VAN REETH, 1999.). Ponekad uzgajivači svinja i veterinari prijave i reprodukcijske poremećaje koji su povezani uz pojavu influence svinja.

Influenca svinja je bolest vezana uz dišni sustav. Viremija se vrlo rijetko primjećuje (BROWN i sur., 1993.). Pokušaji utvrđivanja replikacije virusa izvan dišnog sustava bili su neuspješni. Nakon infekcije kapljičnim putem i naseljavanja na sluznicu dišnih putova, virus se umnaža u nosnoj sluznici, tonzilama, dušniku, traheobronhalnim limfnim čvorovima i plućima (NAYAK i sur., 1965.; LANZA i sur., 1992.). Čini se da su pluća glavni ciljni organ dok virus pokazuje jaki i specifični tropizam prema stanicama bronhalnog cilijarnog epitela (NAYAK, i sur., 1965.; HAESEBROUCK i PENSAERT, 1986.; BROWN i sur., 1993.).

Primarni način prenošenja je izravno sa svinje na svinju te ekskretima iz nazofarinksa. Virus se izlučuje u sluznici nazofarinksa u febrilnoj fazi bolesti u kojoj se nalazi dovoljna količina virusa za infekciju prijemljive jedinke (EASTERDAY i VAN REETH, 1999.). Lako aerogeno širenje razlog je nastanka epizootija IS s naglom pojavom u područijima s velikim brojem svinja (GOURREAU i sur., 1980.; VANDEPUTTE i sur., 1980.). Jednom kada virus zahvati stado, u njemu kruži sve dok se ne provede potpuna depopulacija (MADEC i sur., 1985.). U većini slučajeva virus influence isčezne iz stada, a s vremenom u seronegativnih životinja može ponovo izazvati bolest. Akutna pojava bolesti češća je u vrijeme većih izmjena vremenskih prilika i dnevnih temperatura. U Europi, H1N1 i H3N2 sojevi trajno kruže u nekim područjima te su česte zatvorene enzootije. Na enzootski zaraženim farmama usprkos tome što prasad kolostrumom dobiva protutijela u titru koji pruža određenu zaštitu protiv bolesti, količina prenesenih protutijela ipak nije dovoljna da ih zaštiti od infekcije (LAMB i KRUG, 2001.). Virus influence veže se za sijaličnu kiselinu i glikoproteine na površini stanice putem vanjskog dijela hemaglutinina. Mjesto vezanja sijalične kiseline je završna galaktoza tipa alfa 2,3 (u ptica) ili alfa 2,6 (u ljudi) koja određuje specifičnost s obzirom na vrstu (DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.).

2.5. Etiologija influence

Virusi influence (VI) pripadaju rodu *Influenzavirus* te zajedno s rodovima *Thogotovirus, Isavirus i Quaranfilvirus* pripadaju porodici *Orthomyxoviridae* sa segmentiranim RNA genomom (PRESTI i sur., 2009.). VI su pleomorfni, uglavnom kuglasti, veliki 80-120 nm, a imaju lipoproteinsku ovojnicu. Ako su filamentoznog oblika, dužina može doseći i 200-300 nm. Prema razlikama u sastavu virusnih proteina hemaglutinina (H) i neuraminidaze (N), virusi influence dijele se u podtipove. Do sada je poznato osamnaest H podtipova (H1 do H18) i jedanaest N podtipova (N1 do N11) virusa influence (TONG i sur., 2013.).

2.5.1. Klasifikacija virusa influence

Prema grupno-specifičnom antigenu virusi influence podijeljeni su na rodove *Influenzavirus* A, B i C. Virusi influence A i B posjeduju 8 negativno nabijenih RNA segmenata, dok ih virus influence C ima 7. Svaki od segmenata daje kod za jedan ili dva proteina (MAEDA i sur.,

2003.). VI tipa A razlikuju se od tipa B i C na temelju razlike glavnih unutarnjih proteinskih antigena, nukleokapsidnog proteina (NP) i matričnog proteina (M1).

Virusi influence A mogu zaraziti ljude i brojne vrste životinja, uključujući svinje, konje, pse, morske sisavce, ptice i kanadsku kunu (WEBSTER i sur., 1992.). Uslijed prilagodbe novom domaćinu mogu uzrokovati bolest s dalekosežnim posljedicama. Virusi influence B i C javljaju se u ljudi, iako ne isključivo, jer je virus influence tip C izdvojen i iz svinja (YUANJI i DESSELBERGER, 1984.), a influenzavirus B iz tuljana (OSTERHAUS, 2000.).

Tablica 2. Obilježja virusa influence A, B i C

	Influenza A	Influenza B	Influenza C
Domaćin	Ljudi, svinje, konji, ptice, morski sisavci	Ljudi, tuljani	Ljudi i svinje (pas)
Mutacije	Antigenska izmjena i antigensko skretanje	Antigensko skretanje	Antigensko skretanje
Genom	8 genskih segmenata	8 genskih segmenata	7 genskih segmenata
Struktura	11 virusnih proteina	11 virusnih proteina	9 virusnih proteina
	M2 jedinstven	NB jedinstven	HEF jedinstven (hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein)

Izvor: SHORS, T. (2011): Influenza Viruses, 2nd edition.: Understanding viruses. Jones & Bartlett Learning, Burlington, Massachusetts, p. 352.

2.5.2. Struktura virusa influence A

Lipidna ovojnica virusa influence podrijetlom je iz plazmatske membrane stanice domaćina u kojoj se virus umnožava. Morfološka svojstva virusa influence A ovise o genskim obilježjima, ali i o vrsti stanica u kojima je virus umnožen. Lipidna ovojnica virusa je dvoslojna, a potječe od stanica domaćina. Na njoj se nalaze hemaglutininski i neuraminidazni izdanci te, nešto manje, M2-protein. Čvrstoću virusnoj čestici daje matrica koja se formira od M1-proteinskog segmenta (DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.).

Najznačajnija karakteristika virusa influence A je lipoproteinska ovojnica s oko 500 izdanaka (10-14 nm) koji strše iz lipidne ovojnice. Izdanke čine hemaglutinini koji su štapićastog oblika i neuraminidaze u obliku gljiva. Omjer HA i NA je uglavnom 4:1 ili 5:1. Virusni matrični protein

M1 leži ispod dvostruke lipidne ovojnice i povezuje se s ribonukleoproteinskim kompleksom (LAMB i KRUG, 2001.). Proteini virusa influence A i pripadajući geni koji ih kodiraju prikazani su u sljedećoj tablici (tablica 3).

Tablica 3. Geni i proteini virusa influence A

Gen	Segment	Veličina segmenta (nt)	Kodirani protein	Uloga proteina
1	Polimeraza B2 (PB2)	2341	Polimeraza B2 (PB2)	Replikacija virusa (RNA-polimeraza, uzima 5'-metilgvanozinsku „kapu“ od mRNA domaćina koja se koristi za početnicu pri sintezi pozitivne jednolančaneRNA.)
2	Polimeraza B1 (PB1)	2341	Polimeraza B1 (PB1)	RNA-polimeraza
			PB1-F2	Inducira apoptozu
3	Polimeraza A (PA)	2233	Polimeraza A (PA)	RNA-polimeraza, replikacija virusa
4	Hemaglutinin (HA)	1778	Hemaglutinin (HA)	Veže se za stanične receptore
5	Nukleoprotein (NP)	1565	Nukleoprotein (NP)	Veže se uz segmente RNA-genoma, prepisivanje RNA
6	Neuraminidaza (NA)	1413	Neuraminidaza (NA)	Enzim koji cijepa sijalinsku kiselinu, potreban za izlazak sintetiziranih viriona iz stanice domaćina
7	Matriks (M)	1027	Matriks 1 (M1)	Matrični protein
			Matriks 2 (M2)	Strukturni protein i ionski kanal
8	Nestrukturni (NS)	890	Nestrukturni 1 (NS1)	Nestrukturni protein, uloga u sprečavanju imunosnog odgovora stanice domaćina i u sintezi virusne RNA
			Nestrukturni 2 (NS2)	Regulacija životnog ciklusa virusa, pogotovo prepisivanje mRNA, sudjeluju u prijenosu rinbonukleoproteina iz jezgre u citosol

Izvor: LAMB, R. A., R. M. KRUG (2001) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology 4th ed. Lippincott Williams i Wilkins, 1487 - 1531.

Genom virusa influence A je segmentirana jednolančana, negativne polarnosti RNA koja se sastoji od 8 segmenata prekrivenih proteinom nukleokapside. Ukupna dužina genoma je 12.000-15.000 nukleotida (nt) (DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.). Vjesnička RNA (engl. messenger RNA – mRNA) prepisuje se iz virionske RNA pomoću RNA-ovisne RNA polimeraze. Osam segmenata virusa influence A kodiraju za 9 strukturnih proteina (PB1, PB1-F2, PB2, PA, HA, NA, NP, M1 i M2) te dva nestrukturna proteina (NS1 i NS2) (LAMB i CHOPPIN, 1983.).
Osam segmenata genoma virusa influence tip A prekriveno je nukleokapsidnim proteinima te zajedno grade ribonukleoprotein (RNP).

Unutarnji proteini (PB2, PB1, PA, NS1 i NS2)

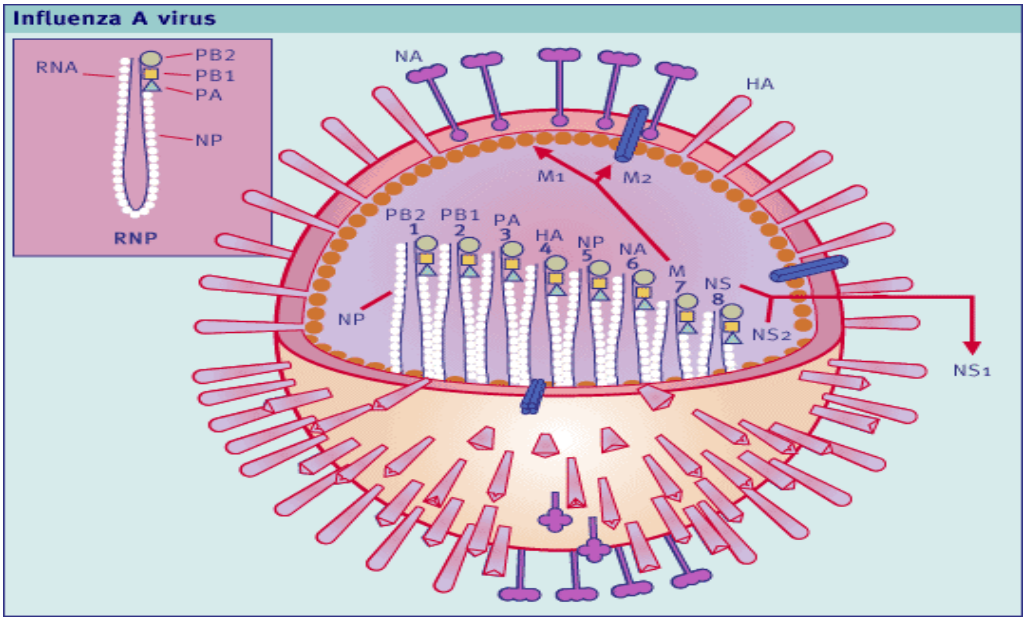
Polimeraza B2 (PB2) kodiran je prvim RNA segmentom. Dio je proteinskog kompleksa koji omogućuje aktivnost virusne RNA-ovisne RNA polimeraze.

Polimeraza B1 (PB1) kodiran je drugim RNA segmentom. Ima ulogu u RNA polimeraza kompleksu odnosno u sintezi mRNA i vRNA. Protein PB1 nalazi se u jezgri inficirane stanice.

Protein polimeraza A (PA) kodiran je trećim RNA segmentom te se također nalazi u jezgri inficirane stanice i dio je RNA-ovisno RNA polimeraza kompleksa zajedno sa PB1 i PB2 (WEBSTER, i sur., 1992.).

Nestrukturni proteini NS1 i NS2 također pripadaju skupini unutarnjih proteina VIS A. NS1 glasnička RNA nosi poli-A rep na 5' kraju. NS1 formira dimer koji inhibira izlazpoli-A s mRNA molekulama iz jezgre, dajući pri tom prednost virusnoj RNA koja se prenosi u ribosom te prevodi (engl. translation). NS1 vjerojatno može inhibirati spojna mjesta u pre-mRNA. Dodatno, NS1 vjerojatno može potisnuti tvorbu interferona u stanici zaraženoj virusom i time omogućuje neometanu replikaciju virusa.

NS1 i NS2 imaju regulatornu funkciju u procesu sinteze virusnih sastojaka u zaraženoj stanici.



Slika 2. Shematski prikaz virusa influence tip A

Izvor: MURPHY, B.R., R.G. WEBSTER (1996): Orthomyxoviruses. U: Fields Virology. 3rd ed. (Fields, B.N., D.M. Knipe, P.M. Howley, ur.), Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1353-1445.

Površinski glikoproteini (HA i NA)

Hemaglutinin (HA)

Hemaglutinin jest glikoprotein koji ima 2 ili 3 glikosilatična mjesta, a molekulska masa mu je oko 76.000. U lipidnu ovojnicu ugrađen je tako da je na površini prisutno najmanje 5 antigenskih domena. Hemaglutinin služi kao receptor za vezanje na sijalinsku kiselinu (N-acetil-neuraminidinska kiselina) i kasniji ulazak virusnih čestica u stanice domaćina mehanizmom membranske fuzije. Hemaglutinin je glavni antigen virusa influence s A, B, C, D i E postojećim područjima vezanja, tzv. antigenska područja nalaze se na vrhu molekule, dok je donji dio ugrađen u lipidni sloj. Molekula hemaglutinina posjeduje područje cijepanja koje je potrebno da bi membranskom fuzijom virus inficirao novu stanicu. Zbog niskog pH fuzijski je peptid uvučen u unutrašnjost stanice, putem trimera hemaglutinina čime se oblikuju fuzijske pore (WILSON i COX, 1990.). Značajne mutacije na karakterističnim antigenskim područjima hemaglutinina smanjuju ili onemogućuju vezanje neutralizacijskih protutijela i tako omogućuju novom podtipu da se širi kroz imunosno naivnu populaciju (DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.).

Neuraminidaza (NA)

Neuraminidaza je glikoprotein koji se nalazi na površini virusa kao tetramer s molekulskom masom od 220.000. Vidljiva je na površini virusa. Djeluje kao enzim cijepajući sijalinsku kiselinu čime se molekula hemaglutinina odvaja od površine stanice. Njezina je uloga također nužna pri ulasku virusa u dišni epitel. Antigensko skretanje može nastati i u NA jer ona sadržava nekoliko važnih aminokiselinskih ostataka koji u slučaju mutacije čine molekularnu osnovu rezistencije prema inhibitorima neuraminidase (DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.).

Nestrukturni proteini (NS1 i NS2)

Nestrukturni proteini kodirani su osmim segmentom RNA. NS1 ima višestruku ulogu, posebno u samoj virulenciji. Pronađen je u velikoj količini u jezgri stanica inficiranih virusom influence ali ne i u samom virionu. NS2 ima važnu ulogu u prijenosu rinbonukleoproteina iz jezgre u citosol.

Nukleokapsidni protein (NP)

Nukleokapsidni protein (NP) kodiran je petim segmentom RNA. Osnovna uloga NP je inkapsuliranje genoma virusa influence u svrhu transkripcije i replikacije RNA.

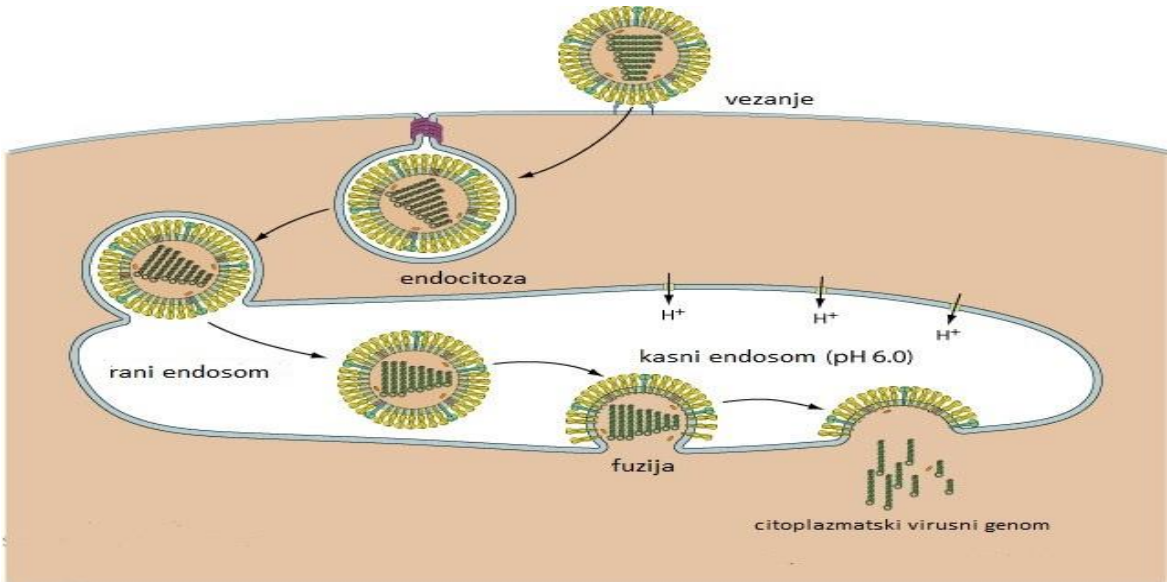
Matrični protein (M1 i M2)

Matrični protein M1 tvori matricu isključivo kod virusa influence A dok M2 djeluje kao pumpa ionskih kanala da bi se smanjio i održao pH endosoma.

2.6. Replikacija virusa

Za replikaciju je potrebna aktivna RNA-RNA-polimeraza koju formiraju PB1, PB2 i PA. Ona posjeduje endonukleaznu aktivnost i djeluje na RNP. Nestrukturni proteini NS1 i NS2 imaju regulacijsku ulogu u inficiranoj stanici. Neki virusni proteini, kao što su fuzijski peptid i NS2 potpomažu nastanak virusnih čestica.

U trenutku kada virusna čestica prodire u stanicu domaćina i oblikuje endosom, aktivnost M2-kanala zbog niskog pH povećava se, a kao rezultat slabi veza između HA i M1. Fuzijski peptid unutar HA se aktivira i hemaglutinin se veže s unutarnjim slojem endosomske membrane. Ribonukleoproteini se oslobađaju iz ovojnice i transportiraju do jezgre gdje se kompleks raskida te dolazi do sinteze virusne RNA (MITNAUL i sur., 2000.; BAIGENT i McCAULEY, 2001.; DRAŽENOVIĆ i BARIŠIN, 2011.).



Slika 3. Shematski prikaz ulaska virusa u stanicu fuzijom virusne ovojnice i stanične membrane

Izvor: htthttp://viralzone.expasy.org/992?outline=all_by_protein

2.7. Antigensko skretanje i antigenska izmjena

Dva su glavna mehanizma kojima se virus influence mijenja: antigensko skretanje (engl. antigenic drift) i antigenska izmjena (engl. antigenic shift). Antigenim skretanjem virus influence se mijenja kontinuirano, dok je antigenska izmjena nepredvidiva i događa se samo povremeno. Antigenska svojstva virusa influence tipa A mijenjaju se na oba načina, dok se tip B mijenja samo kontinuiranim procesom antigenskog skretanja (CDC, 2014.).

Antigensko skretanje

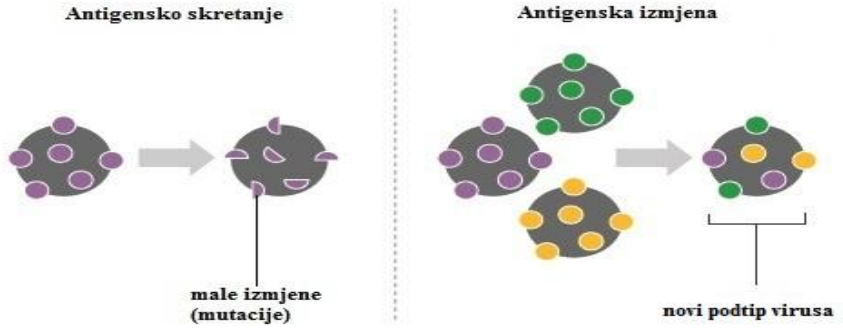
Antigensko skretanje (engl. antigenic drift) je proces postepenog i relativno neprekidnog mijenjanja virusnih HA i NA proteina što proizlazi iz nakupljanja točkastih mutacija u genima HA i NA tijekom replikacije virusa. Kod antigenskog skretanja ili pomicanja radi se o malim promjenama u sastavu aminokiselina koje izgrađuju površinske izdanke virusa (hemaglutinin i neuraminidazu). Te male promjene rezultiraju pojavom različitih sojeva podtipova virusa koji su i dalje antigenski srodni. Međutim, te male promjene s vremenom se nakupljaju te kroz neki duži vremenski period rezultiraju pojavom podtipa koji se u značajnijoj mjeri razlikuje od svog izvornog pretka. U tom slučaju inficirani organizam neće moći u potpunosti zaustaviti razvoj bolesti. Određeni podtip virusa influence potiče tvorbu specifičnih protutijela. Kako se promjene na virusu s vremenom nakupljaju, protutijela nastala na soj koji je potaknuo njihovu tvorbu, neće s vremenom moći prepoznati „noviji“ antigenski promijenjen virus te dolazi do pojave bolesti. Ovako malo antigenski promijenjeni virusi uzrokuju epidemije svake godine u primljivoj populaciji. Međutim, ne obolijevaju sve jedinke u populaciji jer još uvijek ima i onih koji imaju učinkovita protutijela na virus koji kola u populaciji, a pretrpio je antigenske promjene.

Antigenska izmjena

Antigenska izmjena (engl. antigenic shift) je proces u kojem dolazi do izmjene, odnosno preslagivanja RNA segmenata podrijetlom od dvaju ili više različitih podtipova virusa koji istodobno inficiraju istu stanicu. Posljedično nastane potpuno novi podtip virusa jer dolazi do promjene u sastavu površinskih antigena (HA, NA) (WHO, 2002.).

Ova promjena je rezultat preslagivanja (preraspodjele, odnosno izmjene velikih dijelova genoma) koja se javlja kada dva ili više podtipova virusa istodobno inficiraju jednu stanicu

(slika 4.). Osim istodobne infekcije jedne stanice različitim tipovima virusa, preduvjet za preslagivanje je i segmentirani genom - jedna od posebnosti virusa influence.



Slika 4. Atigenskoskretanje i izmjena

Izvor: https://microbiologyinfo.com/differences-between-antigenic-shift-and-antigenic-drift/

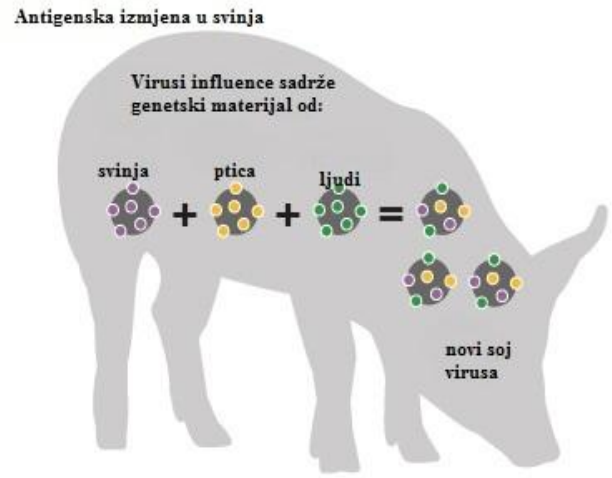
Nadalje, da bi novonastali podtip s presloženim genomom bio dovoljno različit da izazove pandemiju, potrebno je da se geni ljudskog soja preslože sa životinjskim. To se redovito događa u svinji budući da svinje mogu biti domaćin svinjskim, ljudskim i ptičjim podtipovima virusa. Iako je uobičajeno da životinjski tipovi virusa ne izazivaju infekciju u ljudi, preslagivanjem u svinja virusi mogu zadržati segmente ljudskog podtipa koji im omogućuju infekciju ljudi, a istodobno steći potpuno nove segmente koji potječu od nekog životinjskog soja (URBANIAK i MARKOWSKA-DANIEL, 2014.). Izvor novih podtipova u životinjskom svijetu vrlo često su patke u kojih se infekcija virusom influence očituje kao infekcija probavnog sustava bez simptoma. Virus se među njima vrlo lako širi te se često javljaju istodobne infekcije s više podtipova što omogućava preslagivanje i stvaranje novog podtipa.

Najsvježiji primjer preslagivanja čija je posljedica bila pojava pandemije u ljudi nova je pojava virusa „svinjske gripe“ podtipa A H1N1 u Meksiku u travnju 2009. godine. Ta presloženica nastala je preslagivanjem genoma triju roditeljskih sojeva: 1) H1N2 trostruko presloženog virusa koji posjeduje ptičje, ljudske i svinjske gene izdvojenog iz svinja Sjeverne Amerike oko 1999./2000. godine; 2) H1N1 svinjskog virusa ptičjeg podrijetla izdvojenog u Europi između 1991. i 1993. godine i 3) H3N2 svinjskog virusa ptičjeg podrijetla izoliranog u Aziji oko 1999./2000. godine (GIBBS i sur., 2009.). Konačan rezultat je virus čiji se genom sastoji od: tri segmenta podrijetlom od svinjske sjevernoameričke linije, dva segmenta podrijetlom od svinjske

euroazijske linije, dva segmenta ptičjeg podrijetla i jednog segmenta ljudskog virusa (URBANIAK i MARKOWSKA-DANIEL, 2014.).

2.8. Uloga svinje u prijenosu virusa influence

Svinja je važna za međuvrsni prijenos virusa jer na epitelnim stanicama dušnika ima α-2,3 i α-2,6 galaktoza sijalinsku kiselinu kao receptore. Čovjek pretežito ima α-2,6 galaktoza sijalil, a ptice na epitelnim stanicama sluznice crijeva imaju α-2,3 galaktoza sijalil. Prema tome, svinja ima presudnu posredničku ulogu (posrednički domaćin) za međuvrsni prijenos virusa influence. Podtipovi virusa influence patogeni za perad najčešće ne izazivaju značajnije zdravstvene poremećaje u ljudi i obratno. Međutim, virusi influence ptica i čovjeka mogu se umnožavati u svinji. Pri istodobnoj infekciji virusom influence podrijetlom od čovjeka u svinji dolazi do preslagivanja virusa, odnosno do preslagivanja virusnih gena i do nastanka novih podtipova virusa (MADIĆ i LOJKIĆ, 2004.).



Slika 5. Primjer stvaranja novog soja virusa u svinji
Izvor: http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/8021799.stm

2.9. Imunološki odgovor na infekciju virusom influence

Opsežna replikacija u epitelnim stanicama bronha i plućnih alveola javlja se tijekom prvih 5 do 6 dana nakon infekcije, a oko sedmog dana dolazi do nestanka viremije (VAN REETH i sur., 2002.). Tijekom akutne faze bolesti stvaraju se proinflamantorni citokini poput IFN-α (interferon α), TNF-α (čimbenik tumorske nekroze alfa), IL-1 (interleukin 1), IL-6, IL-12 i IFN-γ (interferon gama) (BARBE i sur., 2011.).

Zaražavanje svinja samo jednim podtipom VIS može pružiti potpunu zaštitu od naknadnih infekcija homolognim virusom te djelomičnu zaštitu od infekcije uzrokovane heterolognim podtipovima VIS, ali usprkos tom saznanju, cjelokupna priroda imunološkog odgovora u svinja još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.

Do sada je utvrđena zaštitna uloga virusno-specifičnih imunoglobulina i to: IgA i IgG u nosnom i bronhoalveolarnom ispirku (BAL-engl. bronchoalveolar lavage), zatim IgA, IgG i IgM u serumu inficiranih svinja (LEE i sur., 1995.).

U bronhoalveolarnom ispirku svinja pokusno inficiranih podtipovima H1N1 i N3N2 javlja se povećani broj neutrofilnih granulocita, NK stanica te CD4 i CD8 T-limfocita. U svinja pokusno inficiranih pandemijskim H1N1 virusom influence aktiviraju se CD4 i CD8 T-limfociti u perifernoj krvi 6. dan nakon infekcije (engl. postinfection day, PID) (LANGE i sur., 2009.). Također, u bronhoalveolarnom ispirku i krvi svinja inficiranih virusom influence pronađeni su proliferativni limfociti, a u traheobronhalnim limfnim čvorovima i slezeni stanice koje luče virusno-specifični IFN-γ (CHARLEY, 1977.; KHATRI i sur., 2010.).

2.10. Laboratorijska dijagnostika

Metode koje se koriste za dijagnostiku IS i njihova primjena opisane su u priručniku "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" od strane svjetske organizacije za zdravlje životinja (World Organisation for Animal Health, Office International des Episooties - OIE). Popis metoda i njihova primjena opisane su u tablici 4.

Tablica 4. Dostupne metode za dijagnostiku influence svinja te njihova primjena(OIE,2015.)

Metoda	Namjena					
	Populacija slobodna od infekcije	Pojedinačne životinje slobodne od infekcije; prije stavljanja u promet	Doprinos eradikaciji	Potvrda kliničkih slučajeva	Nadzor prevalencije infekcije	Imuni status u pojedinih životinja ili populaciji nakon vakcinacije
Utvrđivanje uzročnika[1]						
Izdvajanje virusa	+	+++	++	+++	++	-
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	+++	+++	-
RT PCR	-	-	-	++	-	-
Određivanje imunosnog odgovora						
IHA	+	+	+	++	++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+

+++ = preporučena metoda; ++ = prikladna metoda; + = moguće je koristiti u određenim prilikama ali trošak, pouzdanost i drugi faktori jako ograničavaju njihovu primjenu; - neprikladna metoda za ovu namjenu.
Antigen ELISA-e proizvedene su samo za uporabu u klinički bolesnih životinja jer je njihova namjena u zdravih životinja upitna. IHA=inhibicija hemaglutinacije.
1 = u nekim prilikama potrebno je rabiti više metoda za utvrđivanje uzročnika

2.10.1. Serološke metode za dokazivanje protutijela za virus influence svinja

ELISA testovima (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) uglavnom se određuju protutijela za virus influence A, no na tržištu postoje različiti testovi za određivanje podtipova koji kruže na određenom području.

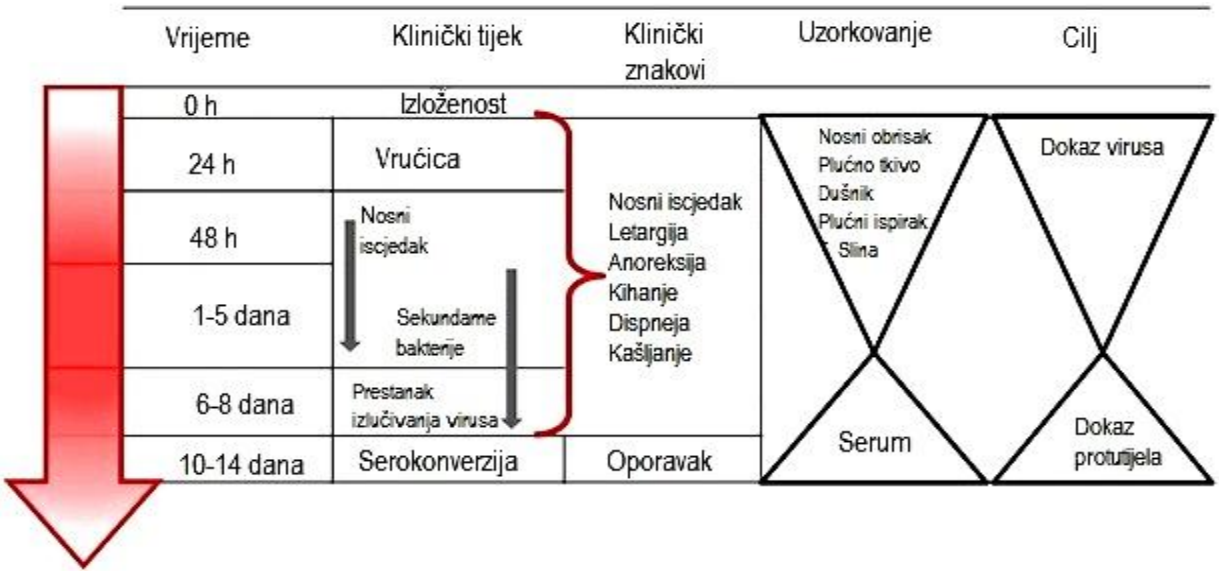
ELISA testovi za dokazivanje protutijela pripravljeni su na osnovi vezanja protutijela za antigen kojim je obložena mikrotitracijska pločica. Najčešće se radi o kvalitativnim metodama kojima se ne određuje titar virusa nego dokazuje da je pojedina životinja ili skupina životinja u tijeku svog života bila izložena infekciji virusom influence. ELISA testovi kojima možemo utvrditi titar protutijela (najčešće se radi o titru protutijela za virus influence A, a ne za određene podtipove) mogu se koristiti za procjenu učinkovitosti vakcinacije, ako se ona provodi.

Osnovni serološki testovi za utvrđivanje protutijela za određeni podtip virusa influence A su inhibicija hemaglutinacije i inhibicija neuraminidaze. U svrhu dijagnostike rabe se parni serumi prikupljeni u razmaku od 10 do 21 dana. Četverostruko ili veće povećanje titra između uzimanja prvog i drugog uzorka upućuje na svježu infekciju virusom influence (Anonimno, 2010.). Ukoliko nam nisu dostupni parni serumi, tada uz pomoć referentnih antigena utvrđujemo kojim je podtipom virusa influence životinja tijekom života bila zaražena.

Dodatni serološki testovi koji su opisani u literature su gel difuzijski precipitacijski test u agaroznom gelu (AGID), neizravna imunofluorescencija (IFA - indirect fluorescent antibody) i virus-neutralizacijski test (VNT).

2.10.2. Dokazivanje virusa influence u kliničkim uzorcima

Uspješno izdvajanje virusa postiže se prikupljanjem uzoraka unutar 24-48 sati nakon početka kliničkih znakova. Uzorci se uzimaju od životinja koje su u akutnoj fazi bolesti s povišenom temperaturom. Virus se može utvrditi u nosnim obriscima, slini, bronhoalveolarnom sadržaju i plućnom tkivu. Za izravne metode uzorke bi trebalo prikupiti tijekom početne faze bolesti kada dolazi do izlučivanja virusa. Neizravne metode poput dokazivanja protutijela trebalo bi koristiti nakon što se virus prestane izlučivati iz organizma kako bi se utvrdio imunološki odgovor na infekciju (slika 6.).



Slika 6. Prikupljanje ciljnih uzoraka za izravan ili neizravan dokaz virusa i dijagnozu infekcije virusom influence tip A u svinja.

Izvor: https://www.pig333.com/swine-influenza/detection-and-diagnosis-of-influenza-a-virus-infection-in-swine_9426/)

2.10.2.1. Imunohistokemijski postupak (IHK)

Imunohistokemijske metode se odnose na proces dokazivanja specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen. Ova metoda se provodi na tkivima fiksiranim formalinom za razliku od imunofluoroscencije koja se provodi u svježem tkivu (MEF RIJEKA, 2015.).

2.10.2.2. Molekularne metode

Molekularne metode poput lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. Real Time RT-PCR) i lančana reakcija polimerazom nakon obratnog prepisivanja (RT-PCR) s elektroforezom na gelu koriste se za dijagnostiku virusa influence te su najčešće usmjerene dokazivanju matričnog proteina ili nukleoproteina te određivanju podtipova virusa influence A.

Lančana reakcija polimerazom nakon obratnog prepisivanja (RT-PCR)

RT-PCR je metoda u kojoj je polazni genetski materijal molekula RNA. Budući da se zbog svoje strukture (uracil umjesto timina) ne može izravno amplificirati pomoću DNA polimeraze, u

prvom koraku reakcije RNA se prepiše (transkribira) pomoću enzima reverzne transkriptaze u komplementarnu DNA (cDNA) i zatim je cDNA dovoljna da bude kalup za amplifikaciju segmenta RNA od interesa. Na ovaj način se može dokazati transkripcija jednog gena u točno određenom tkivu ili stanici. Eksponencijalna amplifikacija nakon reverzne transkripcije daje metodi visoku osjetljivost koja omogućuje da se vrlo mali broj ili čak samo jedna jedina RNA molekula uspješno dokaže. RT-PCR je našao široku primjenu u dijagnostici različitih bolesti, a posebno u analizama ekspresije gena u različitim tkivima.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real time PCR)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real time PCR) je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula mRNA. Kako su za reakciju potrebne vrlo male količine mRNA, ova metoda može se koristiti za pretraživanje vrlo malih količina uzoraka. U toj metodi proizvodi reakcije obilježeni su fluorescencijskom bojom i dokazuju se u trenutku nastanka. Boja se veže na dvolančanu (novonastalu) DNA, pri čemu se emitira fluoroscencija. Mjerenjem razine fluorescencije mjeri se količina nastale DNA jer je razina fluoroscencije razmjerna količini PCR produkta.

Krivulja razdvajanja molekula (disocijacijska krivulja) mjeri razinu fluorescencije u odnosu na temperaturu. Tako se ovom metodom može odrediti i trenutak razdvajanja (melting point) u kojem se dva lanca DNA odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Na taj način se provjerava specifičnost produkta, jer svi produkti za specifičan par početnica moraju imati istu krivulju razdvajanja (engl. melting curve). Danas se u praksi najčešće rabe fluorescencijski oligonukleotidi (sonde Taqman). Metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnica i specifične obilježene sonde (AMBRIOVIĆ RISTOV i sur., 2007.).

2.10.3. Izdvajanje virusa influence A

Virus se može izdvojiti na linijskim staničnim kulturama te u embrioniranim kokošjim jajima.

Linijska stanična kultura koja se najčešće koristi je MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) no osjetljivost na VIS pokazuju i stanice svinjskog bubrega, testis i pluća ili stanice dušnika svinja (ANONIMNO, 2010.).

2.11. Vakcinacija

Na tržištu su dostupne inaktivirane komercijalne vakcine protiv IS koje sadrže cijeli virus. Uglavnom se radi o dvovalentnim ili trovalentnim vakcinama koje sadrže podtip H1N1 i/ili H3N2 i/ili H1N2. U skladu s antigenskim i genskim razlikama između podtipova VIS koji kruže u Europi i Americi, vakcine se proizvode za svako područje posebno i sadrže različite sojeve virusa. Trenutno, čak ni unutar kontinenata ne postoje standandizirani vakcinalni sojevi virusa. Rekombinantne vakcine od proteinskih podjedinica, vektorske i DNA vakcine te vakcine oslabljene reverznom genetikom testirane su u eksperimentalnim uvjetima, ali za sada još nisu dostupne na tržištu (VAN REETH i MA, 2013.). U Hrvatskoj se, za sada svinje ne cijepe protiv influence.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Tema ove disertacije je pojavnost VIS u uzgojima svinja u RH. U našoj zemlji do sada nije provedeno opsežnije serološko istraživanje influence svinja, a molekularna istraživanja i analiza sojeva koji kruže u našoj i okolnim zemljama jugoistočne Europe nikad nisu provedena. Podatcima o seroprevalenciji te antigenskoj i genskoj strukturi VIS uklapaju se u dosadašnja istraživanja u Europi. Influenca svinja koja se istovremeno javlja s ostalim bolestima, nanosi velike ekonomske gubitke u uzgojima u Europi i svijetu. Virusi influence zastupljeni sui u ljudi, ptica te velikom broju sisavaca, a svinja predstavlja jedinku u kojoj može doći do preslagivanja gena. Istraživanje je poduzeto s ciljem da se serološki i molekularno dokažeVIS u obiteljskim gospodarstvima i velikim komercijalnim uzgojima svinja. Imunoenzimnim testovima (ELISA) i postupkom inhibicije hemaglutinacije pretraženi su uzorci krvog seruma različitih dobnih skupina svinja s ciljem određivanja protutijela za podtipove VIS koji kruže u RH. Probirnim molekularnim postupkom analizirani su uzorci plućnog tkiva i nazofaringealni obrisci radi dokazivanja gena M, a iz pozitivnih uzorakazatim izdvojen je VIS na linijskoj kulturi MDCK stanica i kokošjim embrijimakoji je poslužio kao temelj za daljnja molekularna istraživanja. Utvrđivanje nukleotidnih sljedova izolata VIS i filogenetska analiza, određuje njihov položaj na filogenetskom stablu europskih i svjetskih izolata. Umnoženi VIS je pohranjen i rabljen kao referentni antigen u postupku inhibicije hemaglutinacije.

Dobiveni rezultati daju uvidu proširenost virusa influence svinja i doprinose boljem razumijevanju njegovih antigenskih i genskih obilježja u RH.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

Pretraženi su uzorci krvi svinja dostavljeni u Laboratorij za serološku dijagnostiku virusnih bolesti pri Hrvatskom veterinarskom institutu u sklopu rutinskih pretraživanja. Uzorci plućnog tkiva uzorkovani su iz lešina svinja dostavljenih također u svrhu rutinskog pretraživanja u Laboratorij za patološku morfologiju pri HVI. Nosni obrisci svinja prikupljeni su od strane veterinarske službe ovlaštene za pojedine velike uzgoje.

Za istraživanje su prikupljeni uzorci podrijetlom od domaćih svinja iz velikih komercijalnih i malih obiteljskih uzgoja, s različitih područja RH (tablica 5). Svi istraživački zahvati provodili su se sukladno aktualnim zakonskim propisima RH, uz poštivanje etike (Kodeks veterinarske etike, Etički Kodeks hrvatskog društva za znanost, Zakon o zaštiti okoliša NN 82/94, Zakon o dobrobiti životinja NN 19/99, Pravilnik o uvjetima kojima moraju udovoljavati farme i uvjetima za zaštitu životinja na farmama NN 136/05).

Tablica 5. Metode pretrage i broj pretraženih uzoraka svinja držanih u farmskim i obiteljskim uzgojima po županijama

ŽUPANIJA	Broj pretraženih uzoraka seruma		Broj pretraženih uzoraka metodom imunohistokemije	Broj pretraženih uzoraka molekularnim metodama	
	Farmski uzgoj	Obiteljski uzgoj	Pluća	Pluća	Obrisak
Brodsko-posavska	55	3	5	8	-
Dubrovačko-neretvanska	10	12	-	-	-
Istarska	-	9	-	-	-
Karlovačka	-	37	-	-	-
Osječko-baranjska	583	2	-	-	-
Sisačko-moslavačka	-	9	-	-	-
Šibensko-kninska	-	33	-	-	-
Varaždinska	34	-	-	4	-
Virovitičko-podravska	10	-	-	-	-
Vukovarsko-srijemska	468	-	23	46	29
Zagrebačka	261	10	0	84	-
Ukupno	**1421**	**115**	**28**	**142**	**29**

4.1.1. Prikupljanje, pohrana i priprema uzoraka za istraživanje

Priprema uzoraka krvnog seruma svinja za serološke pretrage

Zaprimljene uzorke zgrušane krvi odvajali smo od stijenki epruveta sterilnim staklenim štapićima i nakon toga centrifugirali u laboratorijskoj centrifugi (ROTINA 420, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka) 10 minuta pri 1900 o/min. Pri centrifugiranju dolazi do taloženja ugruška pri čemu se odvaja serum. Uzorak seruma smo odvojili u novu epruvetu za jednokratnu uporabu i označli izvornim podatcima. Uzorke smo pohranili u zamrzivač na -20˚C do početka pretrage.

Priprema uzoraka plućnog tkiva svinja za imunohistokemijsku pretragu

Lešine svinja razuđene su pomnim pregledom svih organa i organskih sustava prema protokolu, a najznačajnije patoanatomske promjene snimLjene su digitalnim aparatom. Razudba je provedena u Laboratoriju za opću patologiju HVI-a. Tijekom razudbe za imunohistokemijsku pretragu uzeti su uzorci pluća te su fiksirani u 10% - tnom puferiranom formalinu kroz 48 h na +4 °C. Istovremeno, tijekom razudbe uzeti su i uzorci pluća za molekularnu pretragu te su pohranjeni u zamrzivaču na -80 °C do trenutka provođenja pretrage.

Priprema uzoraka za molekularne pretrage

Uzorci pluća

Uzorci pluća svinja bili su usitnjeni izrezivanjem sterilnim škaricama. Kako bi se pripremila 10%-tna suspenzija plućnog tkiva, pomiješali smo 1 g tkiva s 1 mL PBS-a (pH 7,4) te homogenizirali.Homogeniziranje smo učinili na dva načina: a) ručno u sterilnom tarioniku s tučkom (Marienfeld, Njemačka), koristeći sterilni kvarcni pijesak (Kemika, Hrvatska) i PBS, ili b) pomoću homogenizatora FastPrep 24^{TM} (MP Biomedicals, Santa Ana, SAD) pri brzini 4m/sec. tijekom 20 sekundi. Homogenizirano tkivo prenijeli smo u sterilne epruvete i centrifugirali 1 minutu pri brzini od 13400 o/min. Nadtalog smo prebacili u nove epruvete u količini od 300-1000 μL.

Ukoliko je uzorke bilo potrebno pohraniti na dulje vrijeme, nakon zaprimanja i obrade pohranjeni su u sterilnim Eppendorf epruveticama pri temperaturi od -20 °C. Prije pretrage bili su odmrznuti pri sobnoj temperaturi (18 °C do 25 °C).

Obrisci

Obrisci nosa i/ili ždrijela uzimani su od životinja s kliničkom slikom respiratorne infekcije, febrilnih ili bez kliničkih znakova. Obrisci su u transportnom mediju (Deltalab, Spain) bili dostavljeni u Laboratorij u najkraćem mogućem roku, većinom unutar nekoliko sati, a iznimno do 24 sata. Pohranjeni su bili na 2-8 ˚C. U postupku obrade, obrisak smo stavili u epruvete (Eppendorf, 2 mL) s 1 mL sterilnog PBS-a (pH 7,4) ili sterilne fiziološke otopine. Dobro smo ih protresli (Vortex, Tehtnica) te odvojili suspenziju u posebnu sterilnu epruvetu.

Priprema uzoraka za infekciju stanične kulture

Pluća

Uzorke pluća smo homogenizirali u sterilnom tarioniku s tučkom koristeći sterilni kvarcni pijesak i DMEM (Sigma Aldrich, SAD). Homogenat smo pretočili u sterilne epruvete, a zatim centrifugirali pri 3000 o/10 min. Nadtalog smo profiltrirali kroz mikrofiltre pora 0,45 μm (Merck Milipore, SAD) i koristili za infekciju stanične kulture.

Obrisci

Obrisci su obrađeni na isti način kao i za molekularne pretrage.

4.2. Metode

4.2.1. Dokaz protutijela serološkim metodama

Dokazivanje specifičnih protutijela imunoenzimnim testovima (ELISA)

Rabili smo komercijalne komplete. Za dokaz specifičnih anti-nukleoproteinskih protutijela (anti NP At) virusa influence A koristili smo komplet ID Screen® Influenza A antibody competition multispecies (ID.vet, Grabels, Francuska) kojim se utvrđuju protutijela za sve podtipove i

antigenske varijante virusa influence tip A. Za dokaz specifičnih protutijela za podtipove H1N1 i H3N2 koristili smo komercijalne komplete Herd Chek Swine Influenza Virus Antibody Test Kit H1N1 i H3N2 (IDEXX, Westbrook, Maine, SAD) i Swine Influenza H1N1 i H3N2 Antibody Test Kits (ELISA) - Swinecheck® H1N1/H3N2 (Biovet Inc., Kanada). Rezultate optičke gustoće očitavali smo na Sunrise Basic ELISA čitaču (TECAN, Austria) koristeći program Magellan.

Dokazivanje specifičnih protutijela za nukleoprotein virusa influence tip A

Komplet ID Screen® Influenza A antibody competition multispecies (ID.vet, Grabels, Francuska) proizveden je za dokazivanje protutijela protiv nukleokapside virusa influence tipa A te se može koristiti za pretraživanje seruma svinja, konja i ptica. Ovaj postupak temelji se na korištenju monoklonskih protutijela koja se vežu za konzervirane nukleoproteinske epitope virusa influence tipa A.

Antigen nukleoproteina vezan je na stijenke mikrotitracijske plitice u 96 (12 x 8) jažica. Nakon unosa pretraživanog uzorka i kontrolnih uzoraka seruma u jažice, ako u serumu postoje specifična protutijela za antigen NP stvorit će se kompleks protutijelo – antigen te će se na taj način „maskirati“ epitopi na antigenu. Poslije inkubacije i ispiranja dokazuje se prisutnost ili odsutnost svinjskih imunoglobulina konjugatom kojeg čine monoklonska protutijela (anti-Ag A) obilježena peroksidazom hrena (engl. horseradish peroxidase-HRP) a koja će se vezati na preostale slobodne epitope antigena adsorbiranog na stijenci. Suvišak konjugata se nakon inkubacije odstrani ispiranjem i potom se dodaje otopina supstrata koji čini reakciju vidljivom. Nakon dodavanja supstrata pojavit će se boja čija se optička gustoća mjeri spektrofotometrom na 450 nm. Pojava boje označava vezanje konjugata na slobodni antigen na stijenci plitice što se događa kao u testiranom uzorku nije bilo protutijela za virus influence A. Ukoliko nije došlo do pojave boje, specifična protutijela iz uzorka su “maskirala” sve epitope te se konjugat nije mogao vezati na antigen NP. Čitav postupak imunoenzimnog testa proveden je prema uputi proizvođača.

Postupak

- Prije izvođenja testa plitice se drže 10 minuta na sobnoj temperaturi.
- U ELISA pliticu presvučenu antigenom pipetira se 2x100 μL pozitivnog i negativnog kontrolnog uzorka seruma u razrjeđenju 1:10. Zatim se stavlja 100 μL uzorka seruma u preostale jažicena plitici u razrjeđenju 1:40. Kontrolni uzorci seruma i pretraživani uzorci

razrjeđuju se puferom za razrjeđivanje (Diluent Buffer). Plitice se prekriju ljepljivom prozirnom folijom i inkubiraju na 37±2 ^{o}C tijekom jednog sata.

- Nakon inkubacije uklanja se sadržaj, a jažice se isperu 5 puta otopinom za ispiranje (za svaku jažicu potrebno je 300 μL otopine za ispiranje).
- Po ispiranju dodaje se 100 μL otopine konjugata u svaku jažicu. Konjugat se priprema neposredno prije upotrebe i to tako da se razrijedi 1:10 priloženim puferom za razrjeđivanje.
- Prekrivena plitica inkubira se 30 minuta pri temperaturi od 21±5 ^{o}C.
- Nakon toga ukloni se sadržaj iz jažica i ponovi postupak ispiranja 3 puta.
- Doda se 100 μL otopinesupstrata u svaku jažicu. Plitice se inkubiraju u tami 10±1 min. na sobnoj temperaturi.
- Potom se dodaje 50 μL otopine za zaustavljanje reakcije.
- Optička gustoća (engl. optical density - OD) očitava se na spektrofotometru upotrebom filtra od 450 nm

Valjanost testa uvjetovana je sljedećim vrijednostima:

Izmjerena optička gustoća kontrolnog negativnog seruma $OD_{NC} > 0,7$

Izmjerena optička gustoća kontrolnog pozitivnog seruma $OD_{PC} / OD_{NC} < 0,3$

Za svaki uzorak seruma potrebno je izračunati postotak kompetitivnosti (S/N %) koristeći sljedeću formulu:

$$S/N\ \% = \frac{OD\ (uzorak\ )}{OD\ (NC)} x100$$

Tumačenje rezultata

Ako je S/N % ≤ 45% pretraživani uzorak smatra se pozitivnim na protutijela za NP VIS A

Ako je 45% < S/N % < 50% pretraživani uzorak smatra se sumnjivimna protutijela za NP VIS A

Ako je S/N % ≥ 50% pretraživani uzorak smatra negativnimna protutijela za NP VIS A

Dokazivanje protutijela za podtip H1N1 virusa influence svinja komercijalnim ELISA testovima

HerdCheck Swine Influenza Antibody Test Kit – H1N1 (IDEXX, Westbrook, Maine, SAD) je imunoenzimni komplet koji omogućava dokaz protutijela za virus influence svinja podtip H1N1. Mogu se pojaviti križne reakcije u serumu životinja koje su bile izložene različitim podtipovima VIS zbog tvorbe protutijela koja prepoznaju virusne epitope zajedničke određenim virusima

podtipova H1N1 i H3N2. Učestalost i stupanj križnih reakcija kao i osjetljivost testa mijenja se ovisno o vakcinaciji ili izloženosti virusnoj infekciji te o individualnom imunološkom odgovoru u životinja.

Antigen H1N1 vezan je na stijenke polistirenske mikrotitracijske plitice u 96 (12x8) jažica. Nakon unosa seruma u jažicu, ako su specifična protutijela za virus influence svinja prisutna u pretraživanom uzorku seruma, protutijela iz seruma će se vezati za virusni antigen. Nakon višekratnog ispiranja dodaje se konjugat (HRPO; engl. anti-porcine IgG horseradish peroxidase) koji se veže na protutijela prisutna u jažici. Suvišak konjugata se nakon inkubacije odstrani ispiranjem i potom se dodaje supstrat koji čini reakciju vidljivom. Nakon dodavanja supstrata pojavit će se boja čija se optička gustoća mjeri spektrofotometrom, a intenzitet nastale boje srazmjeran je količini protutijela u uzorku.

Postupak

Uzorci i reagensi se pohranjuju na temperaturi od 2 do 7 ºC. Prije izvođenja analize potrebno ih je temperirati na sobnoj temperaturi.

- U ELISA pliticu presvučenu antigenom pipetira se 2x100 μL nerazrijeđenog pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma. Zatim se stavlja 100 μL uzorka seruma u preostale jažice na plitici u razrjeđenju 1:40. Preporuča se raditi uzorke seruma u duplikatu.
- Plitice se inkubiraju na sobnoj temperaturi (22±3 ˚C) tijekom 30 minuta.
- Sadržaj jažica ispire se 3-5 puta otopinom za ispiranje.
- Nakon ispiranja dodaje se 100 μLHRPO konjugata u svaku jažicu.
- Plitice se inkubiraju na sobnoj temperaturi (22±3 ˚C) tijekom 30 minuta.
- Sadržaj jažica ispire se 3-5 puta otopinom za ispiranje.
- Unosi se 100 μL TMB supstrata u svaku jažicu.
- Plitica se inkubira na sobnoj temperaturi 15 minuta.
- Reakcija se zaustavlja dodatkom zaustavne otopine u svaku jažicu.
- Optička gustoća izmjeri se fotometrijski na valnoj duljini od 650 nm.

Kriterij valjanosti

Razlika OD_{650} između negativne i pozitivne kontrole mora biti veća od 0,150 (PCx–NCx > 0,150). Srednja vrijednost OD_{650} negativne kontrole mora biti manja ili jednaka 0,150 (NCx ≤ 0,150).

Ako bilo koji od kriterija nije valjan test treba ponoviti.

Izračun

Za ispravno tumačenje rezultata treba izračunati srednju vrijednost OD_{650} pozitivne kontrole – PCx, srednju vrijednost OD_{650} negativne kontrole NCx i srednju vrijednost OD_{650} svakog uzorka.
S/P omjer pretraženih uzoraka izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$S/P = \frac{\text{Srednja vrijednost uzorka (Sx)} - \text{Srednja vrijednost negativne kontrole (NCx)}}{\text{Sr. vrijednost pozitivne kontrole (PCx)} - \text{Sr.vrijednost negativne kontrole (NCx)}}$$

Tumačenje rezultata

Ako je S/P < 0,40 uzorak se smatra negativnim na protutijela H1N1.
Ako je S/P > 0,40 uzorak se smatra pozitivnim na protutijela H1N1.

Drugi komercijalni test koji smo rabili za pretraživanje seruma na podtip H1N1 je Swine Influenza (H1N1) Antibody Test Kit (ELISA), Swinecheck ® H_1N_1 (Biovet Inc., Kanada). To je kompetitivni neizravni imunoenzimni test za *in vitro* dokazivanje protutijela za H1N1 podtip virusa influence u krvnom serumusvinja. Razrijeđeni uzorci se inkubiraju u mikrotitracijskoj plitici s jažicama obloženim H1N1 antigenom. Ispiranjem plitice uklanjaju se nevezana protutijela te se dodaju monoklonska protutijela specifična za H1N1 antigen. Monoklonska protutijela vežu se za antigene na koje se nisu vezala protutijela iz seruma. Ponavljajućim ispiranjem uklanjaju se nevezane tvari nakon čega se dodaje konjugat (protutijela obilježena enzimom) koji se veže na monoklonska protutijela. Ispiranjem se nakon inkubacije uklanja višak konjugata. Reakcija se vizualizira dodavanjem TMB kromogen supstrata (TMB – tetrametilbenzidin) koji će u prisutnosti enzima promijeniti boju u plavo. Reakcija se zaustavlja dodavanjem zaustavne otopine i očitava pri valnoj duljini od 450 nm.

Priprema reagensa i uzoraka seruma za pretraživanje

- Koncentriranu otopinu za ispiranje potrebno je razrijediti u omjeru 1:25 u destiliranoj vodi
- Uzorci seruma razrjeđuju se otopinom za ispiranje u omjeru 1:10
- Monoklonska protutijela razrjeđuju se otopinom za ispiranje u omjeru 1:400

- Konjugat se razrjeđuje gotovim puferom za konjugat u omjeru 1:75

Izvođenje testa

- U određene jažice na mikrotitracijskoj plitici unesu se kontrolni uzorci seruma i prethodno razrijeđeni pretraživani uzorci.
- Plitica se inkubira pri 23±2 ˚C tijekom 1 sata. Nakon toga se ispire sadržaj plitice otopinom za ispiranje 4 x 300 µL.
- U svaku jažicu se dodaje 50 µL monoklonskog protutijela. Slijedi inkubacija pri 23±2 ˚C tijekom 15 minuta.
- Nakon inkubacije, na monoklonska protutijela naslojava se 50 µL otopine konjugata (u svaku jažicu), promiješa i inkubira pri 23±2 ˚C tijekom 15 minuta.
- Sadržaj plitice se ispere na prethodno opisan način.
- U jažice mikrotitracijske pliticeunese se po 100 µL supstrata. Plitica se inkubira zaklonjena od izravnog svjetla pri 23±2 ˚C tijekom 10 minuta.
- Reakcija se zaustavlja dodavanjem zaustavne otopine.
- Rezultati se očitavaju pri valnoj duljini od 450 nm unutar 15 minuta po zaustavljanju reakcije.

Računanje rezultata

Za ispravno tumačenje rezultata treba izračunati srednju vrijednost OD_{450} negativne kontrole (mODneg), srednju vrijednost OD_{450} pozitivne kontrole i OD_{450} otopine za ispiranje.

Postotak inhibicije (PI%) ispitivanih uzoraka, pozitivne kontrole i otopine za ispiranje računa se prema sljedećoj formuli:

$$PI\ (\%) = \left[1- \left[\frac{OD\ uzorka\ /PK/OI}{mODneg}\right]\right] \times 100$$

Kriterij valjanosti

Srednja OD vrijednost negativne kontrole i otopine za ispiranje mora biti veća od 0,8

PI (%) pozitivne kontrole (PK) mora biti >85%

Tumačenje rezultata

Uzorak se označava kao pozitivan na protutijela za H1N1 ako je PI (%) ≥ 30%

Uzorak se označava kao negativan na protutijela za H1N1 ako je PI (%) < 30%

Dokazivanje protutijela za podtip H3N2 virusa influence svinja komercijalnim ELISA testovima

HerdCheck Swine Influenza Antibody Test Kit – H3N2 (IDEXX, Westbrook, Maine, SAD) je imunoenzimni komplet koji omogućava dokaz protutijela za podtip H3N2 virusa influence svinja u serumu. Princip testa i izračun rezultata je isti kao i kod testa za podtip H1N1 istog proizvođača osim što je sama plitica presvučena H3N2 antigenom, a tumačenje rezultata je sljedeće:

Ako je S/P omjer manji od 0,30 uzorak se označava kao negativan na prisutnost protutijela za virus H3N2.

Ako je S/P omjer veći od 0,30 a manji od 0,40 uzorak se označava kao sumnjiv i mora ga se ponovo pretražiti.

Ako je S/P omjer veći od 0,40 uzorak se označava pozitivnim na prisutnost protutijela za virus H3N2.

Drugi komercijalni ELISA komplet za dokazivanje protutijela za podtip H3N2 koji smo rabili je Swine Influenza Antibody Test Kit (ELISA), Swinecheck ® H_3N_2 (Biovet Inc., Kanada).

Neparne kolone mikrotitracijske plitice presvučene su antigenom H3N2. Parne kolone nisu presvučene antigenom i služe kao kontrola kako bi bili sigurni da je pozitivna reakcija u kolonama s antigenom zaista rezultat reakcije između protutijela u serumu i antigena specifičnih za podtip H3N2. Protutijela koja su specifična za H3N2 vezat će se za antigen u plitici. Nakon ispiranja dodaje se konjugat s protu-svinjskim protutijelima konjugiranim enzimom peroksidazom. Boja se razvije dodatkom supstrata vezivanjem kromogena za konjugat (označena protutijela). Nakon zaustavljanja reakcije, intenzitet boje (OD, optička gustoća) očitava se spektrofotometrom, a intenzitet boje srazmjeran je količini protutijela u serumu. Test se izvodi prema uputama proizvođača. Inkubacije razrijeđenih seruma, konjugata i supstrata opisane su u tablici 6.

Tablica 6. Inkubacije Swinecheck ® H_3N_2

Inkubacija	Temperatura	Vrijeme
Razrijeđeni uzorci i kontrole iz kompleta	37 ˚C (±2)	30 minuta
Konjugat	37 ˚C (±2)	30 minuta
Supstrat	23 ˚C (±2)	15 minuta

Izračun rezultata

OD_C = optička gustoća (OD) jažice koja nije presvučena kontrolnim antigenom

OD_A = optička gustoća (OD) jažice koja je presvučena H3N2 antigenom

P = pozitivna kontrola

Korektivna vrijednost = $OD_A - OD_C$

Kako bi dobili konačan rezultat koji se tumači omjerom vrijednosti OD jažica s kontrolnim antigenom i bez njega, potrebno je koristiti sljedeću formulu:

$$\text{Omjer OD} = \frac{(OD\ A - OD\ C)}{(OD\ A(P) - OD\ C(P)}$$

Kriterij valjanosti

Omjer OD negativne kontrole mora biti < 0,40

Korektivna vrijednost OD pozitivne kontrole (OD_P) mora biti >0,750

Tumačenje rezultata

Uzorak se smatra negativnim na protutijela za H3N2 ako mu je omjer vrijednosti OD <0,40.

Uzorak se smatra pozitivnim na protutijela za H3N2 ako mu je omjer OD vrijednosti ≥0,40.

4.2.2. Dokazivanje specifičnih protutijela postupkom inhibicije hemaglutinacije

Dokazom, odnosno određivanjem titra, specifičnih protutijela dokazuje se infekcija domaćina određenim mikroorganizmom ili se procjenjuje uspjeh provedene vakcinacije. Virus influence svinja aglutinira eritrocite pijetla, zamorčića i 0-te krvne grupe čovjeka, a aglutinacija može biti inhibirana specifičnim protutijelima. Na tom načelu se zasniva postupak inhibicije

hemaglutinacije (VAN REETH i sur., 2006.) za određivanje protutijela za viruse influence svinja.

Poznata su 2 H serotipa (H1 i H3) te 2 N (N1 i N2) serotipa virusa influence svinja. U testu IHA za viruse influence svinja specifičan antiserum inhibira hemaglutinin te tako izostaje hemaglutinacija. U određenoj mjeri u tom testu križno može reagirati i neuraminidaza (N) virusa influence. Na primjer, ukoliko se radi o protutijelima za virus IS podtipa H1N2, a u testu IHA se rabi antigen podtipa H3N2, tada neuraminidaza tipa N2 može križno reagirati – inhibirati hemaglutinaciju te se može krivo zaključiti da je riječ o protutijelima za virus IS serotipa H3. Da bi se ovo izbjeglo potrebno je u slučaju pozitivnog nalaza protutijela za određeni serotip virusa IS isti uzorak seruma testirati s još jednim antigenom istog H tipa, ali s različitim N tipom (npr. antigenom H1N2 te u slučaju pozitivnog nalaza ponovno s antigenom H1N1). Titar protutijela inhibicije hemaglutinacije (VAN REETH i sur., 2008.) je najveće razrjeđenje seruma koje dovodi do potpune inhibicije hemaglutinacije. Za izvedbu testa rabi se četiri ili osam hemaglutinacijskih jedinica virusa. Prisutnost zahtijevanih hemaglutinacijskih jedinica (HAJ) provjerava se na svakoj mikrotitracijskoj plitici.

Antigeni

Za izvođenje inhibicije hemaglutinacije rabili smo tri soja virusa koji pripadaju euroazijskoj skupini VIS, a kruže Europom:

A/swine/Neth/Best/96 ($H1_{av}N1$), A/swine/Gent/7625/99 ($H1_{hu}N2$) i A/swine/Neth/St Oedenrode/96 (H3N2). Navedeni antigeni i kontrole antigena (H1N1 i H3N2) nabavljeni su iz GD Animal Health, Deventer, Nizozemska.

Enzim koji razara nespecifične inhibitore hemaglutinacije (engl. Receptor Destroying Enzyme - RDE)

Prije samog postupka inhibicije hemaglutinacije, kako bi uklonili nespecifične inhibitore hemaglutinacije koji se nalaze u serumu rabili smo Receptor Destroying Enzyme - RDE (II) „Seiken“ (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan). RDE je filtriran, steriliziran i liofiliziran nadtalog čiste kulture *Vibrio cholerae* tip558 (uzorci seruma se razrijede s RDE u omjeru 1:3 te se inkubiraju pri 37 ˚C tijekom 18-20 sati. Kako bi inaktivirali RDE, uzorke seruma smo nakon toga zagrijavali na 56 ˚C tijekom 30-60 minuta. Za inaktivaciju smo rabili grijanu vodenu

kupeljs mogućnošću podešavanja temperature ili termoblok (TB2 Thermoblock, Biometra GmbH; Göttingen, Germany).

Određivanje hemaglutinacijskog (HA) titra antigena

Odgovarajućom višekanalnom mikropipetom (podesivom na volumen od 25 µL) napunili smo sve jažice mikrotitracijske (MT) plitice s po 25 µL PBS-a (fiziološka otopina natrij klorida puferirana fosfatnim puferom, pH 7,2). U jažice C i D prvog stupca MT plitice dodali smo još po 25 µL PBS-a (za početno razrjeđenje antigena 1:3), a u jažice E i F prvog stupca MT plitice dodali smo još po 75 µL PBS-a (za dobivanje početnog razrjeđenja virusa 1:5).

U jažice od A do F prvog stupca MT plitice dodali smo po 25 µL antigena.

Odgovarajućom višekanalnom mikropipetom (podesivom na volumen od 25 µL) učinili smo dvostruka serijska razrjeđenja antigena u stupcima 1 do 12.

Zatim smo u sve jažice MT plitice dodali po 25 µL PBS-a te nakon toga u sve jažice MT plitice dodali po 25 µL 1%-tnih eritrocita. Pliticu smo protresli pazeći da se sadržaj iz jažica ne izlije i ostavili 40-45 minuta na sobnoj temperaturi (15-30 ˚C) te potom očitali rezultat.

Očitavanje HA titra

U prva dva reda (A i B) pripremljena su serijska razrjeđenja antigena u nizu od 1/2, 1/4, 1/8, itd. do 1/4096. U naredna dva reda (C i D) antigen je bio serijski razrjeđen u nizu od 1/3, 1/6, 1/12, itd. do 1/6144. U naredna dva reda (E i F) učinjena su serijska razrjeđenja antigena u nizu od 1/5, 1/10, 1/20, itd. do 1/10240. U zadnja dva reda (G i H) nalazio se samo PBS i eritrociti. U svim jažicama ova dva reda (G i H) moralo je doći do potpune sedimentacije da bi test bio valjan.

Za očitavanje smo nagnuli MT pliticu pod kutom od 45˚ do 90˚ i sačekali da sedimentirani eritrociti počnu kliziti niz stijenku jažice. Smatra se da je do sedimentacija eritrocita došlo samo u jažicama u kojima eritrociti vidno klize. Označili smo granicu između jažica istog reda u kojima je bila vidljiva aglutinacija i u kojima je došlo do sedimentacije. Odredili smo pri kojem su najvećem razrjeđenju antigena još uvijek javlja aglutinacija. HA titrom antigena se smatrala recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja. Na primjer, ako je najveće razrjeđenje pri kojem je ustanovljena aglutinacija eritrocita 1/320, titar antigena je 320.

Priprema antigena za inhibiciju hemaglutinacije

Dobiveni titar podijelili smo s 4 (npr. ako je titar 320, onda je to 320:4=80). Razrijedili smo antigen u PBS-u u omjeru koji je jednak dobivenom količniku (npr. razrjeđenje u omjeru 1:80 radi se na način da se uzme 1 mL antigena i 79 mL PBS-a ili 100 µL antigena i 7900 µL PBS-a). Na ovaj način pripremLjeni antigen sadrži 4 hemaglutinacijske jedinice (HAJ).

Provjera titra radnog razrjeđenja antigena

U novoj MT plitici pripremili smo dvostruka serijska razrjeđenja antigena u dva reda s početnim razrjeđenjem od 1:2 kako je prethodno opisano. Ukoliko je antigen imao 4 HAJ, eritrociti su u prve dvije jažice jednog reda bili aglutinirani, a u narednim jažicama sedimentirani.

Postupak IHA

- Višekanalnom mikropipetom napunili smo sve jažice MT plitice s po 25 µL PBS-a. U prvu jažicu svakog od prvih 6 redova MT (A do F) dodali smo pretraživane uzorke seruma u količini od 25 µL. U prvu jažicu reda G dodali smo 25 µL pozitivnog kontrolnog uzorka, a u prvu jažicu reda H 25 µL negativnog kontrolnog uzorka.
- Višekanalnom mikropipetom pripremili smo dvostruka serijska razrjeđenja uzorka seruma od 1:2 do 1:4096 (tj. od $1:2^1$ do $1:2^{12}$).
- Dodali smo po 25 µL antigena u sve jažice (4 HA jedinice) i zatim protresli pliticu.
- Pliticu smo inkubirali tijekom 30 do 60 minuta na sobnoj temperaturi (15-30 ˚C).
- U sve jažice MT plitice dodali smo po 25 µL 1%-tnih eritrocita.
- Protresli smo pliticu i ostavili ju 40-45 minuta na sobnoj temperaturi (15-30 ˚C) i potom očitali rezultat.

Očitavanje rezultata

Rezultate smo očitavali na isti način i po istim kriterijima kako je to opisano za očitavanje HA titra, tj. sedimentiranim eritrocitima smatrali su se samo oni u jažicama u kojima je došlo do njihova vidnog klizanja niz stijenku jažice nakon što se MT plitica nagne. IHA titrom određenog uzorka seruma smatra se recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja seruma pri kojem je prisutna inhibicija hemaglutinacije tj. najveće razrjeđenje određenog uzorka seruma pri kojem eritrociti u jažici klize niz stijenku nakon naginjanja. Npr. ako su u redu sa serijskim razrjeđenjima seruma

X nakon naginjanja plitice eritrociti klizili sve do 7. jažice i u 7. jažici, tada je inhibicija hemaglutinacije bila prisutna sve do razrjeđenja seruma od $1:2^7$ tj. 1:128, što znači da je titar uzorka seruma X s korištenim antigenom iznosio 1:128 (ili 2^7) tj. titar predstavlja recipročnu vrijednost najvećeg razrjeđenja seruma pri kojem još uvijek postoji inhibicija hemaglutinacije.
Test se smatrao valjanim ukoliko je :

- provjera titra HA antigena pokazala da je titar zadovoljavajući (tj. 4 HAJ).
- u redu G je utvrđen očekivani titar pozitivnog kontrolnog seruma
- u redu H je dobiven očekivani titar negativnog kontrolnog seruma

Kao pozitivan rezultat smatrala se vrijednost titra IHA (za određeni serum) 1:16 (2^4) ili veći što znači da je uzorak seruma s tim titrom imao specifična protutijela za korišteni antigen.

4.2.3. Dokaz antigena u uzorcima tkiva pluća imunohistokemijskim postupkom

Prasad i svinje razuđene su pomnim pregledom svih organa i organskih sustava prema protokolu, a najznačajnije patoanatomske promjene snimljene su digitalnim aparatom. Tijekom razudbe za histopatološku pretragu uzeti su uzorci pluća, tonzila i medijastinalnih limfnih čvorova te su potom fiksirani u 10%-tnom puferiranom formalinu kroz 48 h na +4 °C. Uzorci pluća za molekularnu pretragu pohranjeni su u zamrzivaču na -70 °C .
Nakon potrebnog razdoblja fiksacije u puferiranom formalinu tkiva su izvađena iz fiksativa i ispirana u cjedilu tekućom vodom. Zatim su tkiva mikrotomskim nožem izrezana na odsječke od 10 x 10 x 3 mm i uložena u plastične kazete. Svaka kazeta je označena brojem protokola. Tkiva u kazetama premještena su u svježi fiksativ tijekom 24 sata. Fiksirana tkiva u kazetama podvrgnuta su procesu dehidracije kroz seriju različitih koncentracija etanola i to sljedećim redosljedom: 15 min 70% etanol, 1 sat 80% etanol, dva puta po 2 sata u 96%-tnom etanolu, 3 puta po 2 sata u 100%-tnom etanolu. Kazete s dehidriranim tkivom pročišćene su od alkohola ispiranjem tri puta po 2 sata u kloroformu. Nakon čišćenja, tkiva su impregnirana parafinom dva puta po 2 sata prije uklapanja u parafinski blok. Tkivo impregnirano u parafin izvađeno je iz kazeta te je uklopljeno u parafinske blokove u stanici za uklapanje tkiva (Leica EG 1150H). Parafinski blokovi su neposredno prije rezanja ohlađeni i izrezani na mikrotomu u rezove debljine 4 μm (Leica RM2255). Parafinski rezovi su u vodenoj kupelji nanešeni na silanizirane predmetnice te su sušeni na sobnoj temperaturi preko noći. Bojenje je provedeno standardnom tehnikom bojenja u svježe pripremljenoj otopini hematoksilina i eozina. Otopina hematoksilina

se sastojala od 1,0 g hematoksilin kristala, 1000,0 mL destilirane vode, natrijeva jodida 0,2 g, 50,0 g amonijeva aluma, 1,0 g limunske kiseline i 50,0 g kloralhidrata. Otopina eozina je sadržavala 1,0 g vodotopivog eozina, 20,0 mL destilirane vode i 80 mL 95%-tnog etanola. Predmetnice s naslojenim rezovima su deparafinirani kroz seriju ksilena i različite koncentracije etanola i to tri puta po 6 minuta u ksilenu, dva puta po 3 min. u 100%-tnom etanolu, dva puta po 3 min. u 96%-tnom etanolu, jedanput po 3 min. u 70%-tnom etanolu i 5 min. u destiliranoj vodi. Nakon toga su obojane tijekom 15 min. u otopini hematoksilina, isprane u tekućoj vodi dok tkivo poprimi plavu boju. Predmetnice su kratko uronjene u 1%-tni kiseli alkohol i bojane dvije minute u otopini eozina, isprane su u tekućoj vodi i potom dehidrirane uranjanjem u 70%-tni etanol da se ukloni višak eozina, dva puta u 96%-tni etanol, dva puta u 100%-tni etanol i zatim tri puta po 3 min. u ksilen. Na predmetna stakalca stavljen je DPX (Sigma- Aldrich®) te su poklopljene pokrovnicama. Tako pripremLjeni histološki preparati promatrani su pod svjetlosnim mikroskopom, a utvrđene specifične mikroskopske promjene su fotografirane (Zeiss Imager 2.A).

Za dokaz virusa influence svinja metodom imunohistokemije rabljena su specifična mišja monoklonska protutijela anti-H1N1/H3N2 (clone 3DH6, IgG_1 Isotype, Ingenasa® inmunologia y genetica aplicada, S.A., Spain) prema već prije opisanom protokolu (Anonimno, 2010). Parafinski rezovi 3 μm bili su naslojeni na silanizirane predmetnice i inkubirani na 60°C kroz 20 minuta, zatim su deparafinirani u ksilolu te dehidrirani kroz seriju različitih postotaka etanola. Endogena peroksidaza blokirana je inkubacijom u 3%-tnom H_20_2 u TBS-u. Rezovi su prethodno obrađeni radi demaskiranja epitopa inkubacijom od 3 minute u Proteinazi K (Dako ®) na sobnoj temperaturi prema uputama proizvođača. Nespecifična reakcija blokirana je inkubacijom 1 sat s 2%-tnim BSA u TBS-u. Primarna protutijela anti-H1N1/H3N2 razrjeđivana su 1/200 u 2% BSA u TBS-u i inkubirana preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je vizualizirana s anti-mišjim sekundarnim protutijelima markiranim s označenim polimerom (Envision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse Ref. K4000, Dako®) prema uputama proizvođača. Za vizualizaciju je korišten DAB kromogen. Predmetnice su diferencijalno bile bojene Mayerovim hematoksilinom, osušene i poklopljene s DPX te pretraživane pod svjetlosnim mikroskopom.

4.2.4. Molekularne metode

Izdvajanje virusne RNA

Za izdvajanje virusne RNA koristili smo uzorke obrisaka sluznice nosa i ždrijela i prethodno pripremljene nadtaloge dobivene homogenizacijom pretraživanih pluća i nadtalog inficirane stanične kulture.

Ručno izdvajanje virusne RNA

Ručno izdvajanje cjelovite RNA proveli smo koristeći komplet *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka) po uputama proizvođača. Komplet je namijenjen izdvajanju cjelovite RNA iz životinjskih stanica i tkiva, kombinirajući svojstvo selektivnog vezivanja na silikatnu membranu kolone i brzinu centrifugiranja. Uzorke smo prvo lizirali i homogenizirali u prisutnosti visoko denaturirajućeg pufera, koji odmah inaktivira RNAze kako bi se osiguralo pročišćavanje netaknute RNA. Dodavanjem etanola osiguravaju se optimalni uvjeti za vezivanje te se uzorak dodaje na RNeasy Mini kolonu, gdje se ukupna RNA veže na membranu kolone, a onečišćenja se učinkovito ispiru u nekoliko koraka. Postupak se završava eluiranjem RNA u 30-100µL vode.

Postupak ručnog izdvajanja virusne RNA iz tkiva pluća

1. 20 - 30 mg usitnjenog tkiva stavljeno je u epruvetu od 1,5mL.
2. Na tkivo je naslojeno 600µL pufera RTL pomiješanog sa 6 µL β-merkaptoetanola.
3. Sadržaj epruvete promiješan je pomoću automatske tresilice 15 sekundi, te nakon toga centrifugiran 3 minute pri 13400 o/min.
4. Nadtalog (lizat) je bio prebačen u čistu epruvetu volumena 1,5 mL.
5. Dodano je 600 µL 96%-tnog etanola i promiješano pipetom.
6. 700 µL sadržaja epruvete prebačeno je u kolonu i centrifugirano pri 10000 o/15 sek.
7. Filtrat je bio odbačen, a kolona stavljena u istu sabirnu epruveticu. Ponovljen je korak broj 6.
8. Dodano je 700 µL RW1 pufera i centrifugirano pri 10000 o/15 sek. Filtrat je bio odbačen a kolona stavljena u istu sabirnu epruveticu.
9. Dodano je 500 µL RPE pufera i centrifugirano 15 sek. pri 10000 okretaja. Filtrat je bio odbačen, a kolona stavljena u istu sabirnu epruveticu. Ponovo je dodano 500 µL RPE pufera i

centrifugirano 2 min. pri 10000 o/min. Ako je potrebno, postupak centrifugiranja se ponovi još 1min/10000 okretaja kako bi se uklonili mogući ostaci RPE pufera.

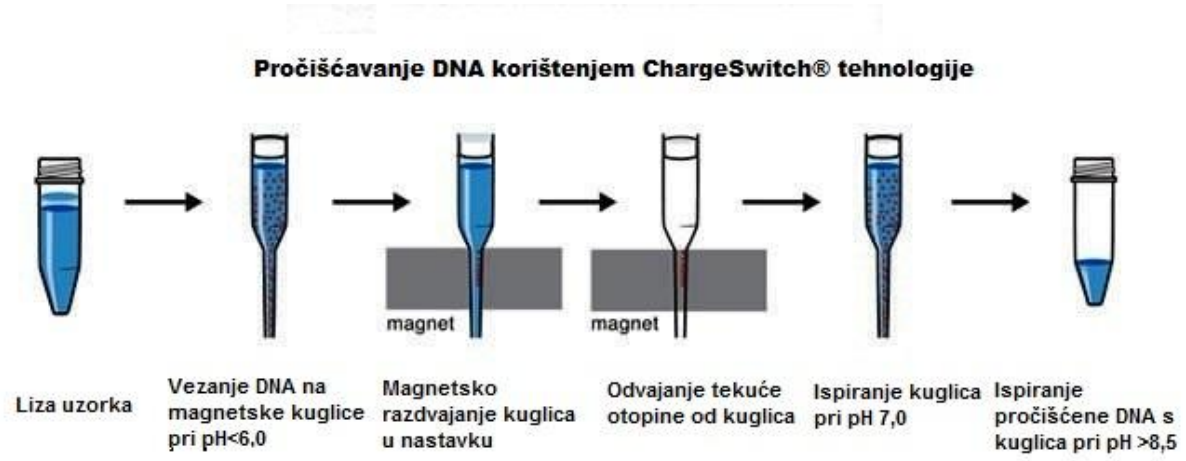
10. Sabirna epruvetica bila je odbačena, a kolona stavljena u sterilnu epruvetu volumena 1,5 mL.

11. Dodano je 30-50 µL vode slobodne od RNaze u središte silikatne membrane te centrifugirano pri 10000 o/1 min.

12. Epruveta s filtratom bila je pohranjena na -80°C.

Automatizirano izdvajanje RNA iz uzoraka

iPrep Total RNA Kit omogućuje brzu i automatiziranu izolaciju ukupne RNA iz različitih vrsta uzoraka, uključujući tkiva/organe, punu krv i serum. Postupak izolacije i pročišćavanja zasniva se na tehnologiji magnetske filtracije u kombinaciji s „ChargeSwitch" tehnologijom. Magnetskom filtracijom omogućuje se ispiranje magnetskih kuglica bez gubitaka jer se „drže" za stranice nastavaka za pipetiranje, dok se „ChargeSwitch" tehnologija zasniva na promjeni površinskog naboja kuglice koji ovisi o pH pufera. Pri niskom pH pufera kuglice su pozitivno nabijene i vežu negativno nabijene nukleinske kiseline. Ispiranje nukleinskih kiselina s magnetskih kuglica (elucija) postiže se neutralizacijom naboja magnetske kuglice povišenjem pH na 8,5 upotrebom pufera za eluciju koji sadži malu koncentraciju soli (slika 7.).



Slika 7. Primjer tehnologije promjene naboja ChargeSwitch®

Izvor: https://www.thermofisher.com/

Obrada uzoraka prije automatiziranog izdvajanja RNA - priprema lizata

Prvi korak u izdvajanju RNA je razgradnja uzorka u visoko denaturirajućim uvjetima (liza) s reagensima koji u isto vrijeme inhibiraju RNaze. RNA se zatim odijeli od ostalih staničnih makromolekula (DNA i proteini) različitim postupcima, ovisno o primijenjenoj metodi. Proteinaza K je enzim koji pospješuje razgradnju proteina do aminokiselina te umanjuje učinak enzima koji mogu uništiti RNA u uzorku.

Nadtaloge homogenata tkiva pluća i obrisaka resuspendirali smo u puferu za lizu (Lysis buffer) iz kompleta iPrep ™ PureLink ™ Total RNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, California, USA) u omjeru 600 µL pufera na 100 µL nadtaloga. Suspenziju smo inkubirali 5 min. na sobnoj temperaturi uz miješanje na električnoj mješalici (Vortex 10, Tehtnica), a potom centrifugirali (centrifuga MiniSpin, Eppendorf) 1 minutu pri 13400 o/min. nakon čega smo 600 µL prebacili u epruvete za uzorke (Sample tubes).

Postupak automatiziranog izdvajanja RNA iz uzoraka

Virusnu RNA izdvojili smo u aparatu iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornija, SAD) uz uporabu kompleta za izolaciju ukupne RNA - iPrep ™ PureLink ™ Total RNA ili kompleta za izolaciju virusne RNA kompleta iPrep ™ PureLink ™Virus kit prema uputama proizvođača.

Konačni volumen izdvojene RNA bio je 50-100 µL. Dobivenu RNA pohranili smo pri -80°C do početka pretrage.

4.2.4.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real time PCR) za dokaz gena matrice (M) virusa influence A

Lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR) rabili smo kako bi proveli probirni test uzoraka pozitivnih na gen M svih podtipova virusa influence A. Koristili smo dva protokola za određivanje konzervirane regije gena M; prvi je opisan u radu (SPACKMAN i sur., 2002.) a drugi protokol je preuzet sa stranica Svjetske zdravstvene organizacije u suradnji sa CDC i ECDC (European Centres for Disease Control and Prevention) (CDC, 2009.).

Protokol za dokaz gena M virusa influence A prema radu SPACKMAN i sur. (2002)

Prvi protokol koji smo koristili u ovom istraživanju je preinačeni protokol prema metodi (SPACKMAN i sur., 2002.) za dokaz virusa influence A, optimiziran za platformu LightCycler 1.5 (Roche, Njemačka). Modifikacija se odnosi na trajanje pojedinih ciklusa dok temperatura, početnice i proba nisu mijenjane. Za metodu je korišten kit LightCycler RNA Master Hybridization Probes (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka) i RNazin (Promega, Madison, SAD) (KUČAK, 2010.). Početnice i proba opisani su u tablici 7.

Tablica 7. Sekvencije početnica i probe korišteni u protokolu prema radu SPACKMAN i sur. (2002)

Naziv početnice	**Sekvencija (5'→3')**
Nizvodna početnica za gen M (M+25)	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
Uzvodna početnica za gen M (M-124)	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
Proba za gen M (M+64)	FAM - TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA -TAMRA*

*FAM = 6-karboksi-fluorescein, TAMRA = 6-karboksi-tetrametil-rodamin

Početnice i proba se resuspendiraju u TE puferu. Za pozitivnu kontrolu se koristi standardizirani sigurno pozivan uzorak živog ili inaktiviranog virusa influence. Za negativnu kontrolu se koristi voda slobodna od nukleaza. Priprema PCR mješavine opisana je u tablici 8.

Tablica 8. Priprema PCR mješavine

Reagens	**Dodani volumen reagensa po reakciji**
Voda slobodna od nukleaza	N x 5,7 µL
Mangan (50 mM stock)	N x 0,6µL
Nizvodna početnica (20 µM)	N x 0,4µL
Uzvodna početnica (20 µM)	N x 0,4µL
RNAsin (40 U/µL stock)	N x 0,1µL
Proba (20 µM)	N x 0,3 µL
LC-RNA-MHP mix (2,7x stock)	N x 7,5 µL
Ukupno	**15µL**

U termoblok se posloži potrebni broj kapilara te se otpipetira po 15 µL PCR mješavine u svaku kapilaru. Doda se po 5 µL RNA u svaku kapilaru. Temperaturni profili prilagođeni korištenom kitu i uređaju LightCycler 1.5 (Basel, Switzerland) prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Temperaturni profili za uređaj LightCycler 1.5

Reverzna transkripcija	61 °C / 20 min
AktivacijaTaq inhibitora	95 °C / 30 sek
PCR amplifikacija (40 ciklusa)	95 °C / 1 sek 60 °C / 20 sek
Hlađenje	40°C / 30 sek

Akvizicija fluorescencije je na kraju svakog ciklusa pri 60 °C s filtrom od 530 nm

Rezultati

Nakon završenog postupka rezultati su prikazani u računalu kao krivulja fluorescencije i kao Ct ili Cp vrijednost (granična vrijednost broja ciklusa) za svaki uzorak posebno. Analiza je valjana ukoliko su pozitivne kontrole dale pozitivan rezultat u očekivanom rasponu, a negativne kontrole negativan rezultat.

Tumačenje rezultata

Amplifikacijsku krivulju pojedinačno za svaki uzorak potrebno je pregledati prije nego se prihvate rezultati računalnog programa.

Uzorci koji imaju Ct vrijednost manju od 30 su pozitivni na gen M virusa influence A.

Uzorci s Ct vrijednosti između 30 i 35 i s oblikom krivulje fluorescencije koji je sigmoidan/logaritamski su nisko pozitivni uzorci nagen M virusa influence A.

Uzorci koji imaju Ct veći od 35 i linearnu amplifikacijsku krivulju, kao i uzorci koji nemaju prikazanu Ct vrijednost, su negativni na gen M virusa influence A.

Uzorci s Ct vrijednošću manjom od 35, a koja je prikazana u uglatim zagradama, kao i uzorci s Ct vrijednošću većom od 35, a koji imaju sigmoidnu/logaritamsku krivulju amplifikacije smatraju se sumnjivim.

Protokol za dokaz gena M virusa influence A (CDC, 2009.)

Druga metoda kojom smo dokazali gen M virusa influence A je Real time RT-PCR metoda sa stranica CDC-a (CDC, 2009., Centres for Disease Control and prevention).

Umnažanje odsječka gena M izveli smo koristeći komplet *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit* (Invitrogen) prema uputama proizvođača uzimajući 5µL RNA u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 µL. Početnice i proba te njihove koncentracije opisane su u tablici 10. TaqMan® proba InfA označena je na 5'-kraju signalnom molekulom 6-

carboxyfluorescein (FAM) i prigušivačem, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) na 3'-kraju (tablica 10).

Tablica 10. Nazivi početnica i probe te njihove koncentracije (CDC, 2009.).

Naziv početnice	**Sekvencija (5'→3')**
Nizvodna početnica InfA	5'GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C 3'
Uzvodna početnica InfA	5'AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA 3'
Proba InfA	FAM-5'TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG 3'-BHQ1

PCR mješavina pripremljena je prema uputi navedenoj u tablici 10. U svaku mikroepruvetu se otpipetira 20 µL PCR mješavine te po 5 µL izdvojene RNA (tablica 11.).

Tablica 11. Priprema PCR mješavine

Reagens	**Dodani volumen reagenasa po reakciji**
Voda slobodna od nukleaza	N x 5,5 µL
Nizvodna početnica (40 µM)	N x 0,5 µL
Uzvodna početnica (40 µM)	N x 0,5 µL
Proba (10 µM)	N x 0,5 µL
SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix	N x 0,5 µL
2x PCR Master Mix	N x 12,5 µL
Ukupni volumen	**N x 20,0 µL**

Temperaturni profili pojedinih ciklusa za uređaj Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, California, SAD) opisani su u tablici 12.

Tablica 12. Temperaturni profili za uređaj Stratagene Mx3005P

Reverzna transkripcija	50 °C / 30 min
AktivacijaTaq inhibitora	95 °C / 2 min
PCR amplifikacija (45 ciklusa)	95 °C / 15 sek 55 °C / 30 sek*

*Akvizicija fluorescencije (FAM) je na kraju svakog ciklusa pri 55 °C

Rezultati

Nakon završenog postupka rezultati su prikazani kao Ct vrijednost za svaki uzorak posebno. Analiza je valjana ukoliko su pozitivne kontrole dale pozitivan rezultat u očekivanom rasponu a negativne kontrole negativan rezultat.

Tumačenje rezultata

Uzorci koji imaju Ct vrijednost manju od 40 su pozitivni na gen M virusa influence A.

Uzorci koji imaju Ct veći od 40 i linearnu amplifikacijsku krivulju, kao i uzorci koji nemaju prikazanu Ct vrijednost, su negativni na gen M virusa influence A.

4.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokaz gena HA virusa influence svinja

Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u jednom koraku (engl. *One step RT-PCR*) provedena je za dokazivanje gena HA VIS A koristeći početnice prethodno opisane u radovima (HOFFMANN i sur., 2001.; PHIPPS i sur., 2004.; CHIAPPONI i sur., 2012.)

Umnažanje ciljnih odsječaka gena HA prema radu CHIAPPONI i sur. (2012)

Početnice pripremljene prema radu CHIAPPONI i sur. (2012) korištene su s namjerom razlikovanja H1 od H3 ili H1 podrijetlom od ptica (nadalje u tekstu $H1_{av}$) od H1 humanog podrijetla (nadalje u tekstu $H1_{hu}$) i H3. Na taj način moguće je brže utvrditi $H1_{av}N1$, $H1_{hu}N2$ i H3N2 podtipove virusa, kao i presložene viruse koji su izmijenili svoje HA i NA gene poput presloženog $H1_{av}N2$ ili $H1_{hu}N2$ (SIMON i sur., 2014.). Nazivi početnica i veličine pojedinih umnoženih odsječaka prikazani su u tablici 13.

Tablica 13. Početnice za umnažanje odsječaka gena HA (CHIAPPONI i sur., 2012.)

Naziv početnice	Sekvencija (5'→3')	Produkt umnožavanja	Očekivana veličina produkta (bp)
H1N1 F	CTGCACTGAAAGCTGACACC	H1 av-like	327
H1N1 R	GCTGCTCCCTTAATTCCTCA		
H1N2 F	GCTACCATGCGAACAATTCA	H1 hu-like	241
H1N2 R	TCAGCATTTGGTGTTTCTGC		
H3 -175f	CARATTGARGTGACHAATGC	H3	722
H3-896r	GGTGCATCTGAYCTCATTA		

$^{(R)}$A/G, $^{(Y)}$C/T, $^{(D)}$G/A/T, $^{(H)}$A/C/T

Umnažanje cijelog genaHA prilagođenim protokolom prema radu HOFFMANN i sur., (2001)

Parom univerzalnih početnica za gen HA prema radu HOFFMANN i sur., 2001. pokušali smo umnožiti cijeli gen HA. U reakciji su upotrijebljene početnice Bm-HA-1 F i Bm-NS-890R a očekivana veličina produkta bila je oko 1800 baznih parova. Nazivi početnica i veličine umnoženog produkta prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. Početnice za umnažanje cijelog gena HA (HOFFMANN i sur., 2001.)

Naziv početnice	Sekvencija (5'→3')	Očekivana veličina proizvoda (bp)
Bm-HA-1 F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	~ 1800
Bm-NS-890 R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	

Umnažanje očuvane HA2 regije unutar HA gena prema radu PHIPPS i sur. (2004)

PHIPPS i sur. (2004) su uspoređivanjem oligonukleotidnih sekvencija za 9 virusa influence A koji predstavljaju 7 H podtipova (H1, H2, H3, H4, H6, H10 i H11) otkrili visoku homolognost između pozicija 1134-1156 gena HA te priredili par početnica koji se temelji na očuvanim sekvencijama unutar HA2 kodirajuće regije. Nizvodnu početnicu HA-1134-F (PHIPPS i sur., 2004.) i uzvodnu početnicu Bm-NS-890R (HOFFMANN i sur., 2001.) koristili smo kako bi dobili specifičan umnožak za HA segment veličine oko 640 bp. Nazivi početnica i veličine umnoženog produkta prikazani su u tablici 15.

Tablica 15. Početnice za umnažanje odsječaka gena HA (PHIPPS i sur., 2004.)

Naziv početnice	Sekvencija (5'→3')	Očekivana veličina proizvoda (bp)
HA-1134-F	GGAATGATHGAYGGNTGGTATGG	~ 640
Bm-NS-890 R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	

Umnažanje odsječaka gena HA metodom RT-PCR

Sve dosada navedene metode RT-PCR izvedene su u jednom koraku koristeći komplet *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen,

Carlsbad, SAD) slijedeći upute proizvođača. Temperaturne cikluse prilagodili smo uputama proizvođača za navedeni komplet.

Postupak

U sterilnu epruvetu zapremine 200 μL dodali smo 7,5 μL sterilne destilirane vode, 12,5 μL reakcijskog pufera, po 0,5 μL svake početnice i 1 μL mješavine enzima reverzne transkriptaze i Taq polimeraze. Reakcijsku mješavinu smo promiješali i na kraju dodali 3 μL izdvojene RNA iz ispitujućih uzoraka. Komponente reakcijske smjese prikazane su u tablici 16.

Tablica 16. Sastav PCR-reakcijske smjese od 25μL.

Sastojak	**Volumen**
Reakcijski pufer 2x (0.4 mM dNTP Mix i 3.2 mM MgSO4)	12,5 μL
Nizvodna početnica (10 μM)	0,5 μL
Uzvodna početnica (10 μM)	0,5 μL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	1 μL
Sterilna voda oslobođena od nukleaza	7,5 μL
RNK izdvojena iz uzoraka	3 μL

Pripremljene reakcijske mješavine u epruvetama stavili smo u uređaj za PCR *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD) uz slijedeći protokol temperaturnih ciklusa:

Sinteza cDNA i početna denaturacija		**Denaturacija**	**Sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)**	**Produljenje lanca**	**Završno produljenje lanca**
1 ciklus		40 ciklusa			
45 °C	94 °C	94 °C	55 °C	68 °C	68˚ C
30 min	2 min	15 sek	30 sek	90 sek	5 min

Korištene su negativna i pozitivna kontrola. Negativna je kontrola (kontrola kontaminacije) sadržavala samo PCR reakcijsku smjesu bez uzorka cDNA. Pozitivna je kontrola bila pripremljena od uzorka koji se tijekom istraživanja pokazao pozitivnim na prisutnost RNA VIS.

4.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokaz gena NA virusa influence svinja

Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u jednom koraku (engl. one step RT-PCR) provedena je za dokazivanje NA gena VIS A koristeći početnice prethodno opisane u radovima (HOFFMANN, i sur., 2001.; FEREIDOUNI i sur., 2009.;CHIAPPONI i sur., 2012.).

Umnažanje ciljanih odsječaka gena NA metodom RT-PCR prema raduFEREIDOUNI i sur. (2009)

FEREIDOUNI i sur. (2009) opisali su specifičnu RT-PCR metodu koja obuhvaća 9 poznatih podtipova neuraminidaza. U pripravljanju početnica koristili su 43 referentna izolata podrijetlom od različitih životinjskih vrsta. U ovom istraživanju koristili smo početnice za odsječke gena N1 (126 bp) i N2 (362 bp) čiji su nazivi i pozicije u referentnoj sekvenci navedeni u tablici 17.

Tablica 17. Početnice za umnažanje ciljanih odsječaka gena NA (FEREIDOUNI i sur., 2009.)

Naziv početnice	Sekvencija (5'→3')	Dužina (bp)	Pozicija u referentnoj sekvenciji	Očekivana veličina proizvoda (bp)
N1-F	AGRCCTTGYTTCTGGGTTGA	20	1209–1228	126
N1-R	ACCGTCTGGCCAAGACCA	18	1334–1317	
N2-F	GCATGGTCCAGYTCAAGYTG	20	548–567	362
N2-R	CCYTTCCAGTTGTCTCTGCA	20	909–890	

Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u jednom koraku provedena je kako bi se umnožio ciljani odsječak N1 gena duljine 126 bp i N2 gena duljine 362 bp. Reakcije su provedene za svaki odsječak posebno.

Za umnažanje odsječaka koristili smo komplet *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, SAD) slijedeći upute proizvođača. Napravljena je reakcijska smjesa od 25 µL koja je sadržavala 12,5 µL 2x Reaction Mix pufera (sadrži 0.4 mM svakog dNTP-a i 3.2 mM MgSO4), 0,5µLnizvodne početnice (10 µM), 0,5 µL uzvodne početnice (10 µM), 1µLSuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix, 3µL RNA i sterilne vode do 25 µL. Reakcije reverzne transkripcije i umnažanja specifičnih odsječaka gena N1 i N2 u jednom koraku izvedene su u uređaju *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD) uz temperaturne cikluse kako je navedeno u tablici 18.

Tablica 18. Temperaturni ciklusi (FEREIDOUNI i sur., 2009.)

Sinteza cDNA i početna denaturacija		*„Touchdown“ PCR ciklus*			Denaturacija	Sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)	Produljenje lanca	Završno produljenje lanca
1 ciklus		5 ciklusa			30 ciklusa			
50 °C	95 °C	94 °C	60°C (snižavanje temp. za 1°C po ciklusu)	68 °C	94 °C	54 °C	68 °C	68 °C
30 min	2 min	15 sek	30 sek	1 min	15 sek	15 sek	1 min	5 min

*„Touchdown“ PCR ciklusi povećavaju specifičnost same reakcije tako da se temperatura kod sparivanja početnica postepeno smanjuje. Početna temperatura sparivanja početnica trebala bi biti nekoliko stupnjeva iznad očekivane temperature razdvajanja početnica T_m (engl. melting temperature - temp. taljenja). Temperatura sparivanja se nakon toga postupno smanjuje dok ne dosegne izračunatu temperaturu sparivanja početnica ili dok ne bude nekoliko stupnjeva niža. Umnažanje se potom nastavlja uz navedenu temperaturu sparivanja.

Umnažanje ciljnih odsječaka gena NA metodom RT-PCR prema raduCHIAPPONI i sur. (2012)

Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u jednom koraku prema autorima CHIAPPONI i sur. (2012) provedena je kako bi se umnožili ciljani odsječci gena NA duljine 514 bp i 791 bp. Nazivi početnica i produkti umnožavanja navedeni su u tablici 19.

Tablica 19. Početnice za umnažanje ciljanih odsječaka gena NA (CHIAPPONI i sur., 2012.)

Naziv početnice	**Sekvencija (5’→3’)**	**Produkt umnožavanja**	**Očekivana veličina proizvoda (bp)**
N1 F	TGAAATACAATGGCATAATAAC	N1	514
N1 R	GGATCCCAAATCATCTCAAA		
N2 F	GGAAAAGCATGGCTGCAT	N2	791
N2 R	GTGCCACAAAACACAACAAT		

$^{(R)}$A/G, $^{(Y)}$C/T, $^{(D)}$G/A/T, $^{(H)}$A/C/T

Umnažanje cijelog gena NA metodom RT- PCR prema radu HOFFMANN i sur. (2001)

Metodu opisanu u radu HOFFMANN i sur. (2001) koristili smo kako bi amplificirali čitav gen NA pomoću univerzalnih početnica. Početnice osmišljene za svaki segment sadrže specifične nukleotide za virus influence na kraju 3' i nukleotide koji nisu podrijetlom od virusa influence na kraju 5'. Sljedećim parom početnica autori su umnožili osam odsječaka podtipova N1, N2, N4, N5, i N8. U konačnici je nastao par početnica kojim bi se umnožila cijela cDNA, odredili podtipovi virusa koje bi se kasnije moglo sekvencirati. Početnice su prikazane je u tablici 20., sastav PCR reakcijske smjese u tablici 21, a temperaturni ciklusi u tablici 22.

Tablica 20. Početnice za umnažanje cijelog gena NA (HOFFMANN i sur., 2001.)

Naziv početnice	**Sekvencija (5'→3')**	**Proizvod umnožavanja**	**Očekivana veličina proizvoda (bp)**
Ba-NA-1	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	N1 i N2	1413
Ba-NA-1413r	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGT TTTTT		

Tablica 21. Sastav PCR-reakcijske smjese volumena 25 μL.

Sastojak	**Volumen**
Reakcijski pufer 2x (0.4 mM dNTP Mix i 3.2 mM MgSO4)	12,5 μL
Nizvodna početnica (10 μM)	0,5 μL
Uzvodna početnica (10 μM)	0,5 μL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	1 μL
Sterilna voda oslobođena od nukleaza	7,5 μL
RNK izdvojena iz uzoraka	3 μL

Tablica 22. Prilagođeni temperaturni ciklusi za umnažanje cijelog gena NA

Sinteza cDNA i početna denaturacija		**Denaturacija**	**Sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)**	**Produljenje lanca**	**Završno produljenje lanca**
1 ciklus		40 ciklusa			
45 °C	94 °C	94 °C	55 °C	68 °C	68˚ C
30 min	2 min	15 sek	30 sek	90 sek	5 min

Elektroforeza umnoženih odsječaka u agaroznom gelu

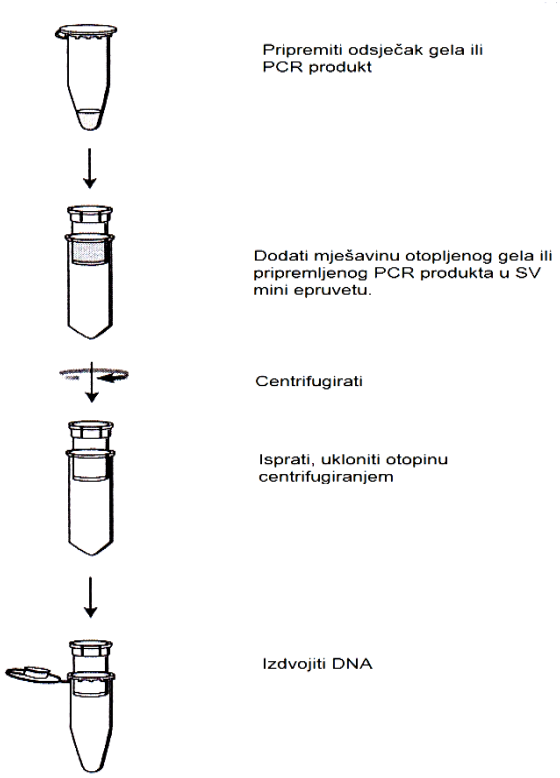
Elektroforezu smo izvodili u 1,5%-tnom agaroznom gelu veličine 100 x 115 x 40 mm (širina x duljina x visina) priređenom u 1 x TBE-puferu (Tris-borat-EDTA buffer, Invitrogen, SAD). Isti pufer smo koristili i tijekom elektroforeze. Rastopljenom gelu smo prije izlijevanja u nosač dodali odgovarajuću količinu fluorescentne boje koja se veže za DNA molekulu i na taj način omogućava njenu vidljivost prilikom osvjetljavanja s UV svjetlom (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, Lonza). Elektroforezu smo provodili tijekom 40 do 60 minuta, ovisno o veličini PCR produkta, pri sobnoj temperaturi uz primjenu inicijalnog napona od 70 V. Nakon što su uzorci krenuli iz jažica napon smo povećali na 90 V. U jažice smo stavljali 9 µL PCR-produkta kojemu smo na parafilmu dodali 1µL obojenog pufera za elektroforezu (10x *Blue Juice Gel Loading Buffer*, Invitrogen, SAD). Obojeni pufer olakšava unošenje uzoraka u jažice i praćenje tijeka elektroforeze. Kao standard za određivanje veličine u parovima baza (bp) koristili smo 5µL markera (*100 bp DNA Ladder,* Invitrogen, SAD). Rezultate smo očitali pomoću UV-transiluminatora (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska).

Pročišćavanje PCR-proizvoda

Pozitivni uzorci bili su izdvojeni iz gela i pročišćeni kompletom reagensa *Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System*(Promega, SAD) u skladu s uputama proizvođača.

U slučajevima nespecifičnog umnožavanja kod PCR-a uz prethodnu reverznu transkripciju, odnosno kada se nakon agarozne elektroforeze osim odsječaka očekivane veličine, uoče i oni nespecifični, proveden je postupak ekstrakcije i pročišćavanja ciljne DNA izrezane iz agaroznog gela.

Komplet *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* koristi se za pročišćavanje DNA odsječaka veličine od 100 bp do 10 kb iz standardnih ili agaroznih gelova slabije topivosti (engl. „low-melting“) pripremljenih u TAE- ili u TBE-puferu. PCR-produkti pročišćavaju se da bi se uklonili suvišni nukleotidi i početnice, ali kao što je navedeno i nespecifični amplikoni. Nakon što se elektroforezom razdvoje umnoženi DNA odsječci, ciljna se linija izrezuje i komadić gela se otapa u otopini za vezivanje za membranu koja sadrži guanidin-izotiocijanat. Otopljeni komadić gela nanosi se na silikatnu membranu kolone. Nakon vezivanja za silikatnu membranu, mogući se kontaminanti učinkovito ispiru uporabom pufera za ispiranje, a umnoženi odsječak od interesa odstrani se ispiranjem vodom (slika 8).



Slika 8. Pročišćavanje DNA odsječaka (PCR-produkata)

Izvor: protokol kompleta *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System,* Promega

Prije prve uporabe kompleta potrebno je koncentriranoj otopini za ispiranje membrane dodati odgovarajuću količinu 96 do 100%-tnog etanola, prema uputama proizvođača.

Rezultati se očitavaju pomoću UV-transiluminatora (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska), a sterilnim skalpelom izrezuju DNA odsječci odgovarajuće veličine.

Otapanje izrezanog komadića gela obavljeno je pomoću otopine za vezivanje za membranu. Prvo se izvažu prazne epruvete volumena 1,5 mL, a potom epruvete u koje je dodan komadić gela. Masa izrezanog komadića gela jednaka je razlici mase epruvete koja sadrži komadić gela i mase prazne epruvete. Prema masi izrezanog komadića gela određuje se volumen otopine za vezivanje za membranu koji je potreban za otapanje (za 10 mg komadića gela potrebno je 10 µL otopine za vezivanje za membranu). Smjesa komadića gela i otopine za vezivanje za membranu podvrgnuta je vrtloženju te se inkubira tijekom 10 minuta pri temperaturi od 50 °C do 65 °C.

Vezivanje umnoženog odsječka DNA za silikatnu membranu obavlja se u posebnim kolonama koje se uklapaju u sabirne epruvete za centrifugiranje od 2,0 mL. Otopina komadića gela nanosi

se na kolonu, inkubira jednu minutu pri sobnoj temperaturi, te centrifugira jednu minutu pri 13400 o/min. Kolona za vrijeme centrifugiranja propušta tekući sadržaj u sabirnu epruvetu, a DNK se veže za membranu. Sabirna epruveta i filtrat odbacuju se u posudu za otpad, a kolona se stavlja u novu sabirnu epruvetu.

Ispiranje silikatne membrane kolone obavlja se tako da se 700 μL otopine za ispiranje membrane nanese na kolumnu, centrifugira jednu minutu pri najvećem broju okretaja, te odbaci sabirnu epruvetu i filtrat u posudu za otpad, a kolona se stavi u novu sabirnu epruvetu. Zatim se na kolonu nanosi 500 μL otopine za ispiranje membrane, centrifugira pet minuta pri najvećem broju okretaja i odbaci sabirnu epruvetu i filtrat, a kolonu stavi u novu sabirnu epruvetu. Naposljetku se posuši silikatna membrana i pročisti od ostataka etanola centrifugiranjem jednu minutu pri najvećem broju okretaja.

Izdvajanje čiste DNA (elucija) postiže se uklapanjem kolone u čistu 1,5 mL epruvetu uz dodatak 50 μL sterilne, deionizirane vode izravno na silikatnu membranu. Sadržaj se inkubira tijekom jedne minute na sobnoj temperaturi, zatim centrifugira jednu minutu pri najvećem broju okretaja. Kolona se odbacuje, a filtrat je umnoženi odsječak DNA koji se čuva na -20 ^{0}C. Izdvojena i pročišćena DNA ponovno se podvrgne elektroforezi kako bismo se uvjerili u učinkovitost postupka.

4.2.5. Sekvenciranje

Sekvenciranje je izvršeno u tvrtki Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) s nizvodnim i uzvodnim početnicama. Nakon pročišćavanja proizvode smo podijelili u dvije sterilne epruvete od 200 μL (po 20 μL). Početnice za dokazivanje gena HA i NA poslali smo u količini od 7 μL po uzorku i u odvojenim epruvetama 200 μL. Rezultati sekvenciranja su potom obrađeni pomoću računalnih programa dostupnih putem Interneta. Dobivene sekvencije smo prvo usporedili s referentnim izolatima u NCBI Banci gena (eng. *Gene Bank*) pomoću programa BLAST dostupnog na internetskoj stranici http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

4.2.6. Računalne analize nukleotidnih sljedova

Pri računalnim analizama dobivenih sekvencija koristili smo sljedeće programe i programske pakete:

- Programski paket MEGA 7 za filogenetske analize.

- Clustal W za višestruko sravnjivanje sekvenci u svrhu pronalaska mjesta promjena/mutacija u istraživanim nukleotidnim sljedovima, te pripremu podataka za filogenetsku analizu.
- BLAST za pretraživanje baza podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Filogenetska analiza

Sa svrhom pripremanja sekvencija za filogenetsku analizu, korištenjem programa Clustal W, provedeno je višestruko sravnjivanje nukleotidnih sljedova. Osim sekvencija umnoženih odsječaka gena HA i NA VIS A pretraženih uzoraka, u analizu smo uključili i sekvencije referentnih izolata za pojedinu opisanu filogenetsku skupinu (tablica 31).

Filogenetsku analizu izolata proveli smo pomoću programskog paketa MEGA 7 primjenom metode susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*). Pri analizi metodom susjednog sparivanja koristili smo model za zamjenu nukleotida *Tamura-Nei*, a statističku analizu vjerodostojnosti dobivenog filogenetskog stabla proveli smo metodom samoučitavanja (engl. *bootstrap*) uz 1000 ponavljanja. Dobivena filogenetska stabla vizualizirali smo i tehnički obradili izravno u programskom paketu MEGA 7.

4.2.7. Statistička obrada podataka

***Interval pouzdanosti - IP*(engl. confidence interval, CI)**

Interval pouzdanosti predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s izvjesnom vjerojatnosti nalazi određena statistička mjera populacije. Kao takav, interval pouzdanosti je objektivna procjena (ne)preciznosti i veličine uzorka nekog istraživanja. Stoga, na interval pouzdanosti posredno možemo gledati i kao na mjerilo kvalitete uzorka i istraživanja. Ovisno o razini pouzdanosti koju biramo, mijenja se i raspon, tj. granice intervala. Najčešće korišteni intervali pouzdanosti u biomedicinskoj literaturi su 90%-tni, 95%-tni, 99%-tni i nešto rjeđe 99,9%-tni interval pouzdanosti. Što su granice intervala uže, preciznost procjene je veća. U ovom istraživanju koristili smo 95%-tni interval pouzdanosti, koji je u svezi s opće prihvaćenom razinom statističke značajnosti $P<0,05$. Interval pouzdanosti je komplementaran statistički pokazatelj s P vrijednosti (ŠIMUNDIĆ, 2008.).

Hi-kvadrat test

Kako bi odredili statističku značajnost u pojavnosti pozitivnih uzoraka između dobnih skupina, između županija te velikih komercijalnih uzgoja i dvorišnih uzgoja, koristili smo standardni Hi-kvadrat test (χ^2-test).

Ovaj postupak upotrebljava se u većini slučajeva ako se radi o kvalitativnim podacima ili ako tim podacima distribucija značajno odstupa od normalne. χ^2-test računa se samo s frekvencijama pa u račun nije dopušteno unositi nikakve mjerne jedinice. Osnovni podaci istraživanja mogu biti i mjerne vrijednosti, ali u χ^2-test unose se samo njihove frekvencije. χ^2-test vrlo je praktičan test koji može osobito poslužiti onda kada želimo utvrditi da li neke dobivene (opažene) frekvencije odstupaju od frekvencija koje bi se očekivale pod određenom hipotezom (PRIMORAC i PAIĆ, 2005.).

Za definiranje razlike u pojavnosti influence svinja u Hrvatskoj, korišten je χ^2-test. $P \leq 0.05$ se smatra statistički značajnim

4.2.8. Metoda izdvajanja virusa na staničnoj kulturi

Uzorke pozitivne na virus influence A metodom real-time RT-PCR i metodom imunohistokemije inokulirali smo u staničnu kulturu Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

Stanična kultura je dio zbirke Hrvatskog veterinarskog instituta.

Stanice su uzgajane u bocama za kulturu stanica površine 25 i 75 cm^2 (NUNC, SAD) u CO_2 inkubatoru (Memmert, Njemačka) uz 5% CO_2. MDCK stanična linija je uzgajana u DMEM mediju (Dulbecco's Modified Eagle Medium) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. foetal bovine serum, FBS), 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg antibiotika penicilina i streptomicina.

Subkultivacija MDCK stanica

Koristili smo bočice T-75 u kojoj jedan sloj sadrži oko 10^7 stanica

- Odstranili smo hranjivi medij iz bočica i dodali 5mL tripsin EDTA koji je prethodno zagrijan na 37 °C
- Laganim naginjanjem bočice omogućili smo da se tripsin EDTA ravnomjerno rasporedi po cijelom sloju stanica. Nakon toga smo tripsin EDTA odstranili pipetom.

Dodali smo još 5 mL tripsin EDTA i ponovili prethodno navedeni korak. Tripsin smo odlili, ali smo ostavili dio u bočici, dovoljno da prekrije stanični sloj. Tripsin se dodaje kako bi se olakšao ulazak virusa u samu stanicu.

- Inkubirali smo bočicu na 37 °C uz 5% CO_2 dok se sve stanice nisu odvojile od plastične površine bočice (5 do 10 minuta).
- Mikroskopiranjem smo pratili odvajanje stanica s površine bočice.
- Kada su se stanice odvojile, resuspendirali smo ih pipetom i preselili u već pripremljene bočice s hranjivim medijem (DMEM + 10% FBS + 1% ATB).
- Bočice smo držali u inkubatoru s 5% CO_2 pri 37 ˚C.

Priprema organa i briseva za nasađivanje na kulturu stanica opisana je u 3.1.2.4.1. i 3.1.2.4.2.

Inokulacija stanične kulture

- Stanične kulture koje smo pripremili na prethodno opisan način nakon 24-48 sati koristili smo za inokulaciju materijala.
- Nakon ispiranja s 0,05% tripsin-EDTA, stanice smo promatrali pod mikroskopom dok se nisu počele zaokruživati i odvajati od stjenke boce.
- Kako bi prekinuli aktivnost tripsina, dodali smo 6 mL hranjivog medija (DMEM + 10% FBS + 1% ATB).
- Inokulirali smo približno 1-2 mL nadtaloga obrisaka ili homogenata pluća.
- Stanične kulture smo inkubirali pri 37 °C/CO_2 oko 1 sat kako bi omogućili virusu da se adsorbira.
- Nakon toga smo dodali ostatak hranjivog medija (za 75 cm^2 potrebno je do 25 mL a za 25 cm^2 do 10 mL).
- Bočice smo držali na 37 °C/CO_2 i svakodnevno mikroskopom pratili promjene na stanicama na pojavu citopatskog učinka (CPU).
- Nakon 3-7 dana (ovisno o CPU) inficirane stanice smo zamrznuli pri -80 °C. Zatim smo ih naglo odmrznuli te sadržaj centrifugirali pri 3000 o/min. tijekom 10 minuta. Dobiveni nadtalog smo koristili za infekciju stanica u novoj bočici na prethodno opisani način. Ukupno su napravljene 3 pasaže.

4.2.9. Izdvajanje virusa influence svinja u kokošjim embrijima

Obrisci

Transportni medij u kojem su bili dostavljeni obrisci pomiješali smo s malom količinom fiziološke otopine (oko 1 mL) te protresli pomoću vrtložnika i prelili sadržaj u sterilnu epruvetu. Ukoliko su obrisci bili suhi, dodali smo fiziološku otopinu s antibiotikom tako da vrh brisa bude uronjen (0,5 – 1 mL). Protresli smo briseve pomoću vorteksa i prelili približno ½ sadržaja u sterilnu epruvetu te ostavili 1 do 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4 °C.

Sadržaj epruveta centrifugirali smo na 2000 okretaja tijekom 20 minuta i nadtalog koristili za inokulaciju u embrije.

Pluća

Dio dostavljenog plućnog tkiva smo odrezali i usitnili sterilnim škarama i u volumenu od 1-2cm^3 homogenizirali u sterilnom tarioniku pomoću sterilnog tučka. Dodali smo fiziološku otopinu s antibiotikom u 5 do 10 puta većem volumenu (5 – 10 mL) i dobro promiješali te sadržaj prelili u sterilnu epruvetu i ostavili 1 do 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4 °C.

Epruvete s homogenatom centrifugirali smo na 2000 okretaja tijekom 20 minuta i nadtalog koristili za inokulaciju u embrije.

Embrije smo prosvijetlili te na rubu zračne komore nasuprot embriju oprezno probušili otvor na ljusci jajeta. Za jedan uzorak pripremljeno je 3 do 5 embrija. Nakon što smo uvukli nadtalog u brizgalicu, iglom smo kroz napravljeni otvor veličine 3 do 5 mm inokulirali 0,1 do 0,2 mL nadtaloga po embriju. Rupu smo zatvorili uredskim korektorom, lakom za nokte ili ljepilom. Potom smo embrije pohranili u termostatu pri 37 °C.

Inokulirane embrije inkubirali smo tijekom naredna 4 dana uz svakodnevno prosvjetljavanje i provjeravanje jesu li živi i vitalni. Uginule i slabo vitalni embrije provjeravalismo na nazočnost hemaglutinirajućih virusa. Žive embrije 4-og dana inkubiranja povukli smo na 4 °C tijekom najmanje 2 sata ili preko noći kako bi embriji uginuli te smo ih provjeravali na nazočnost hemaglutinirajućeg virusa. Ukoliko embrije nismo mogli kontrolirati 4-og dana nakon inokulacije, postupak smo proveli 5-og dana nakon inokulacije.

Nazočnost hemaglutinirajućeg virusa provjeravali smo tako da smo škarama ili pincetom otvorili ljusku nad zračnom komorom te smo mikropipetom izvukli 0,1 do 0,2 mL alantoisne tekućine

koju smo kapnuli na predmetno staklo. Na kap alantoisne tekućine smo dodali približno istu količinu 10%-tnih eritrocita pijetla te smo naginjanjem stakla izmješali sadržaj. Mješavinu smo promatrali 1 minutu. Ukoliko je u tom vremenu došlo do aglutinacije eritrocita, sterilnom injekcijskom brizgaljkom smo izvukli ostatak alantoisne tekućine u sterilnu epruvetu. Alantoisnu tekućinu smo zatim podvrgnuli serotipizaciji za H1 i H3 podtipove virusa influence svinja.Serotipizacija izdvojenog virusa je učinjena opisanim postupkom IHA u kojem su korišteni monovalentni serumi za H1 i za H3 podtip. Korišteni su serumi A/swine/Neth/Best/96 (H1N1) i A/swine/Neth/St Oedenrode/96 (H3N2) nabavljeni iz GD Animal Health, Deventer.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati serološkog pretraživanja

Imunoenzimni test je najčešća metoda odabira pri pretraživanju velikog broja uzoraka. Tijekom ovog istraživanja na području 11 županija u RH imunoenzimnim testom za dokazivanje protutijela za nukleoprotein (NP) virusa influence svinja pretraženo je 1536 uzoraka krvnog seruma svinja. Protutijela za NP VIS utvrđena su u 466 (30,3 %) uzoraka krvnog seruma. Najveći je postotak pozitivnih reakcija u životinja držanih u obiteljskim gospodarstvima utvrđen u Brodsko-posavskoj županiji (89,7%) dok u Zagrebačkoj županiji nije zabilježen nijedan pozitivan uzorak u obiteljskom gospodarstvu, a samo u jednom od dva pretražena velika farmska uzgoja (F15 i F16) zabilježena je jedna (0,6%) pozitivna životinja (tablica 23.).

Najveći broj pretraženih uzoraka seruma svinja držanih u velikim farmskim uzgojima bio je podrijetlom iz Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije u kojima je svinjogojstvo najrazvijenije. Kako je influenca svinja bolest koja se brzo širi, bilo je za očekivati da će najveći broj pozitivnih životinja biti ustanovljen baš u velikim farmskim uzgojima. Tako se najveća seroprevalencija za VIS pokazala u farmskim uzgojima Osječko-baranjske županije i iznosila je 37,61%, čak 100% u jednom uzgoju, no taj nalaz treba uzeti s rezervom budući da je u navedenom uzgoju pretražen relativno mali broj životinja. Srednja vrijednost seroprevalencije za VIS uz interval pouzdanosti od 95% u navedenim farmskim uzgojima bio je između 33,67 i 41,72%. Nešto niža srednja vrijednost seroprevalencije od 35,61% utvrđena je u farmskim uzgojima Vukovarsko-srijemske županije, a srednja vrijednost uz IP 95% bila je 31,47-40,12%.

Uzorci sigurno pozitivni nakon pretraživanja ELISA postupcima bili su pretraženi na prisutnost protutijela za podtipove H1N1, H3N2 i H1N2 s ciljem utvrđivanja zastupljenosti navedenih sojeva u hrvatskim uzgojima. Gledajući ukupnu prevalenciju u pretraženim županijama, metodom IHA utvrđeno je da je najzastupljeniji podtip bio H1N1 (44,6%), slijede H3N2 (42,7%) i H1N2 (26,3%). U svim serološki pozitivnim uzgojima dokazana su protutijela na sva tri podtipa istovremeno, osim u Istarskoj i Virovitičko-podravskoj županiji te na jednoj farmi u Osječko-baranjskoj županiji (F4) gdje protutijela za podtip H1N2 nisu bila dokazana. U Karlovačkoj i Šibenskoj županiji utvrđena su protutijela samo za podtip H1N1, a na farmi F15 u Zagrebačkoj županiji nije bio dokazan podtip H3N2 (tablica 23.).

Tablica 23. Prikaz seroprevalencije za virus influence svinja te zastupljenost podtipova u farmskim uzgojima i obiteljskim gospodarstvima

Županija	Farma/ obiteljsko gospodarstvo	Ukupno pretraženo ELISA Infl. A	Infl A pozitivno (seroprevalencija)	**Inhibicija hemaglutinacije**			Ukupno pretraženo uzoraka
				Pozitivni / zastupljenosti sojeva u uzgoju			
				H1N1	**H3N2**	**H1N2**	
Brodsko-posavska	OG	58	52 (89,7 %)	10 (17,9 %)	1 (1,8 %)	1 (1,8 %)	56
Dubrovačko-neretvanska	OG	22	10 (45,5 %)	Nije pretraženo			
Istarska	OG	9	4 (44,4%)	1 (25 %)	1 (25 %)	0	4
Karlovačka	OG	37	6 (16,2 %)	4 (66,7 %)	0	0	6
Osječko-baranjska	F1	215	49 (22,8 %)	34 (72,3%)	40 (85,1 %)	32 (68,1 %)	47
	F2	60	22 (36,7 %)	4 (18,2 %)	9 (40,9 %)	1 (4,5 %)	22
	F3	10	10 (100 %)	Nije pretraženo			
	F4	35	25 (71,4 %)	8 (40 %)	5 (25 %)	0	20
	F5	5	3 (60 %)	0	0	0	0
	F6	30	11 (36,7 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)	6
	F7	30	16 (53,3 %)	2 (18,2 %)	2 (18,2 %)	2 (18,2 %)	11
	F8	68	7 (10,3 %)	7 (77,8 %)	1 (11,1 %)	0	9
	F9	90	62 (68,9 %)	16 (34,8 %)	6 (13 %)	6 (13 %)	46
	F10	40	3 (7,5 %)	0	0	0	3
	OG	2	1 (50 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1
Sisačko-moslavačka	OG	9	1 (11,1 %)	Nije pretraženo			
Šibensko-kninska	OG	33	5 (15,2 %)	1 (20 %)	0	0	5
Varaždinska	F17	34	4 (11,8 %)	0	0	0	4
Virovitičko-podravska	F11	10	7 (70 %)	1 (14,3 %)	7 (100 %)	0	7
Vukovarsko-srijemska	F12	95	23 (24,2 %)	10 (41,7 %)	7 (29,2 %)	8 (33,3 %)	24
	F 13	349	134 (38,4 %)	82 (59,4 %)	94 (68,1 %)	55 (39,9 %)	138
	F 14	24	10 (41,7 %)	Nije pretraženo			
Zagrebačka	F15	156	1 (0,6 %)	1 (100 %)	0	1 (100 %)	1
	F 16	105	0	Nije pretraženo			
	OG	10	0	Nije pretraženo			
Ukupno:		**1536**	**466 (30,3 %)**	**183 (44,6 %)**	**175 (42,7 %)**	**108 (26,3 %)**	**410**

Nakon što su svi uzorci bili pretraženi probirnim postupkom (ID Screen® Influenza A antibody competition multispecies, ID.vet, Grabels, Francuska), pozitivni uzorci dodatno su bili pretraženi u cilju određivanja protutijela za određene podtipove VIS-a. Komercijalno dostupni kompleti pokazali su slabu specifičnost za europske sojeve VIS što djelomično možemo opravdati činjenicom da su navedeni kompleti prilagođeni američkom tržištu. Nakon analize uzoraka metodom IHA uvidjeli smo dase nalaz specifičnih protutijela za određeni podtip VI dokazan ELISA testom ne podudara s nalazom protutijelanakon pretraživanja testom IHA kojim smo dokazali specifična protutijela za najzastupljenije podtipove VIS-a u Europi: A/swine/Neth/Best/96 (avian-like H1N1), A/swine/Gent/7625/99 (H1N2) i A/swine/Neth/St Oedenrode/96 (H3N2). Iako su komercijalni ELISA testovi uglavnom namijenjeni primjeni u Americi i Kanadi te se njima se ne mogu u potpunosti razlikovati određeni podtipovi koji kruže u Europi, oni su dobar pokazatelj ukupno pozitivnih uzoraka u kojima se kasnije metodom IHA mogu utvrditi protutijela specifična za podtipove VIS-a. Stoga su podatci u tablici 24. samo orijentacijske naravi i ne mogu se uzeti kao reprezentativni (tablica 24).

Tablica 24. Seroprevalencija prema kategorijama životinja nakon pretraživanja komercijalnim ELISA testovima

Kategorija životinja		Ukupno uzoraka	Komercijalni ELISA testovi					
			Inf A (NP) pozitivno		H1N1 poz.	H3N2 poz.	H1N1 + H3N2 pozitivni	
			n	%	*n*	*n*	*n*	%
Prase	1-4 tjedna	35	8	22,9	7	1	8	22,9
	5-10 tjedana	260	33	12,7	23	5	28	10,8
	11-20 tjedana	249	27	10,8	7	6	13	5,22
Tovljenik >20 tjedana		153	86	56,2	21	6	26	17
Nazimica		278	99	35,6	73	28	74	26,6
Prvopraskinja		70	43	61,4	39	5	43	61,4
Krmača		130	64	49,2	50	13	57	43,8
Nerast		132	17	12,9	9	2	10	7,6
Svinja		229	89	38,9	51	35	56	24,5
Ukupno:		**1536**	**466**	**30,3%**	**280**	**101**	**315**	**20,5 %**

Od ukupno 466 uzoraka seruma koji su dali pozitivan rezultat ELISA testomna prisutnost nukleoproteina (NP) VIS, metodom IHA ih je pretraženo 410. U 255 uzoraka utvrđena su protutijela za barem jedan podtip VIS što znači da je 62,19% životinja bilo pozitivno. Metodom

IHA nismo utvrđivali seroprevalenciju u promatranim uzgojima, nego smo odredili zastupljenost podtipova po uzgojima i kategorijama životinja. U RH se ne provodi vakcinacija životinja protiv influence svinja i titar protutijela ukazuje na izloženost životinja infekciji određenim podtipom virusa tijekom života. Najveći titar na podtip H1N1 zabilježen je u prvopraskinja i krmača (≤512), slijede nerastovi (≤256) te nazimice i tovljenici stariji od 20 tjedana (≤128). U prasadi svih dobnih kategorija i svinja (nepoznata dob)utvrđen je titar niskih vrijednosti (16-34). U prvopraskinja je zabilježen vrlo visok titar protutijela na podtip H3N2 (≤2048), slijede prasad 11-20 tjedana starosti i krmače s titrom ≤512. Kod ostalih dobnih skupina najniži titar protutijela iznosio je 16-128. Najviši titar protutijela za podtip H1N2 je također zabilježen u krmača i prvopraskinja (≤512). U prasadi 5-10 tjedana starosti, tovljenika starijih od 20 tjedana, nazimica i nerastova, titar je bio ≤128, dok su vrijednosti titra od 16-64 zabilježene u sisajuće prasadi i one starosti 11-20 tjedana te u svinja nepoznate dobi (tablica 25.).

Tablica 25. Broj ukupno pretraženih uzoraka seruma po kategorijama svinja metodom inhibicije hemaglutinacije i najveći titar za pojedini podtip

Kategorije životinja	Prasad 1-4 tjedna	Prasad 5-10 tjedana	Prasad 11-20 tjedana	Tovljenici >20 tjedna	Nazimice	Prvo-praskinje	Krmače	Nerastovi	Svinje neutvrđene kategorije
Pretraženo uzoraka	8	38	13	91	74	43	62	19	62
Pretraženi na podtipove	Broj pozitivnih (najveći titar ptotutijela)								
H1N1	6 (1/16)	14 (1/64)	4 (1/32)	22 (1/128)	41 (1/128)	20 (1/512)	40 (1/512)	9 (1/256)	22 (1/16)
H3N2	7 (1/64)	18 (1/128)	4 (1/512)	9 (1/128)	45 (1/128)	30 (1/2048)	51 (1/512)	2 (1/128)	9 (1/16)
H1N2	5 (1/32)	16 (1/128)	4 (1/32)	8 (1/128)	31 (1/128)	20 (1/512)	14 (1/512)	1 (1/128)	9 (1/16)
H1N1+H3N2	1	0	1	1	25	6	19	1	1
H3N2+H1N2	0	5	1	0	8	4	8	0	1
H1N1+H1N2	0	1	2	0	5	0	0	0	4
H1N1+H3N2 +H1N2	5	11	1	6	7	13	9	1	3
Negativni (na sva 3 podtipa)	1	15	7	65	5	10	8	14	34

Zastupljenost protutijela za podtipove VIS utvrđenih metodom IHA prema dobnim skupinama prikazana je u tablici 26.

Tablica 26. Zastupljenost pozitivnih uzoraka seruma na podtipove VIS pretraženih metodom IHA (%) po kategorijama životinja

Kategorije životinja	Prasad 1-4 tjedna	Prasad 5-10 tjedana	Prasad 11-20 tjedana	Tovljenici >20 tjedna	Nazimice	Prvo-praskinje	Krmače	Nerastovi	Svinje neutvrđene kategorije
Pretraženo Uzoraka (*n*)	8	38	13	91	74	43	62	19	62
					IHA (%)				
H1N1	75	36,8	30,8	24,2	55,4	46,5	64,5	47,4	35,5
H3N2	87,5	47,4	30,8	9,9	9,9	69,8	82,3	10,5	14,5
H1N2	62,5	42,1	30,8	8,8	8,8	46,5	22,6	5,3	14,5
Negativno	12,5	39,5	53,8	65	6,8	23,3	12,9	73,7	54,8

Podatci seroloških pretraga statistički su obrađeni. Izračunate su donje i gornje granice prevalencije s 95%-tnim intervalom pouzdanosti, a njihove vrijednosti su prikazane u tablici 27.

Tablica 27. Prikaz izračunatih donjih i gornjih granica prevalencije s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (IP)

Županija	Farma ili dvorišni uzgoj	ELISA Inf A NP protutijela, IP (95 %)	IHA IP (95 %)		
			H1N1	H3N2	H1N2
Brodsko-posavska	DU	79,22-95,17	10-29,84	0,32-9,45	0,32-9,45
Dubrovačko-neretvanska	DU	26,9-65,34	-	-	-
Istarska	DU	18,87-73,33	4,56-69,94	4,56-69,94	-
Karlovačka	DU	7,65-31,14	30,0-90,32	-	-
Osječko-baranjska	F1	17,69-28,85	58,24-83,06	72,32-92,60	53,54-79,61
	F2	25,62-49,32	7,31-38,51	23,26-61,27	0,81-21,8
	F3	72,25-100	-	-	-
	F4	54,95-83,67	21,88-61,34	11,19-46,87	-
	F5	23,07-88,24	-	-	-
	F6	21,88-54,49	3,01-56,35	3,01-56,35	3,01-56,35
	F7	36,14-69,76	5,14-47,7	5,14-47,7	5,14-47,7
	F8	5,07-19,75	45,26-93,68	1,99-43,5	-
	F9	58,72-77,52	22,68-49,23	6,12-25,66	-
	F10	2,58-19,86	-	-	-
	DU	-	-	-	-
Sisačko-moslavačka	DU	1,99-43,5	-	-	-
Šibensko-kninska	DU	6,65-30,92	3,62-62,45	-	-
Varaždinska	F17	4,67-26,62	-	-	-
Virovitičko-podravska	F11	39,68-89,22	2,57-51,32	64,57-100	-
Vukovarsko-srijemska	F12	16,71-33,72	24,47-61,17	14,92-49,17	17,97-53,29
	F 13	33,45-43,6	51,08-67,25	59,94-75,31	32,07-48,2
	F 14	24,47-61,17	-	-	-
Zagrebačka	F15	0,11-3,54	20,65-100	-	20,65-100
	F 16	-	-	-	-
	DU	-	-	-	-
Ukupno:		**28,09-32,69**	**39,89-49,47**	**37,98-47,51**	**22,31-30,81**

Za definiranje razlike u pojavnosti influence svinja u Hrvatskoj, korišten je χ^2-test. P≤0,05 se smatra statistički značajnim.

Prema podatcima iz tablice 26. utvrđena je statistički značajna razlika u pojavnosti između podtipova H1N1 i H3N2 u tovljenika (p=0,018), prvopraskinja (p=0,0492), krmača (p<0,001) i svinja neutvrđene kategorije (p=0,0076) te između podtipova H3N2 i H1N2 u tovljenika starijih od 20 tjedana (p=0,0094). Utvrđena je statistički značajna razlika među podtipovima H1N1 i N1N2 u nazimica (p=0,0325), prvopraskinja (p=0,0492), krmača (p<0,001) i svinja neutvrđene kategorije (p=0,00325).

Tablica 28 je informativnog karaktera, jer se odnosi na *IP (95%)* vrijednosti dobivenih pretragom na protutijela za napravljenim Ab H1N1 i H3N2 ELISA testovima čije rezultate smatramo nereprezentativnima.

Tablica 28.95 %-tni interval pouzdanosti za rezultate dobivene komercijalnim ELISA testovima

Kategorija životinja		Komercijalni ELISA testovi	
		Protutijela za NPVIS A	Ukupno pozitivnih na protutijela za H1N1 i H3N2
		IP (95%)	
Prase	1-4 tjedna	12,07-39,02	12,07-39,02
	5-10 tjedana	9,18-17,29	7,56-15,13
	11-20 tjedana	7,56-15,31	3,08-8,87
Tovljenik>od 20 tjedana		48,29-63,82	11,87-23,73
Nazimica		30,21-41,4	21,77-32,11
Prvopraskinja		49,72-71,95	49,72-71,95
Krmača		40,78-57,72	35,62-52,43
Nerast		8,20-19,66	4,17-13,39
Svinja		32,78-45,31	19,34-30,41
Ukupno (IP 95%):		28,09-32,68	18,56-22,60

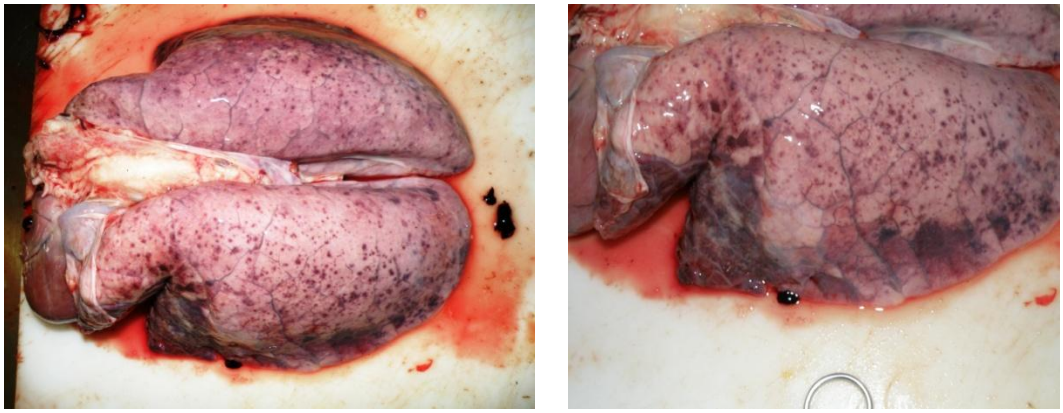
5.2. Patoanatomski nalaz

Razudbeni nalaz svinja uginulih od influence svinja karakteriziraju promjene uglavnom vezane na dišni sustav i posljedičnu asfiksiju odnosno hipoksiju. Vanjskim nalazom dominira cijanoza koja je jasno vidljiva i na koži i na vidljivim sluznicama (slika 9.)

Slika 9. Cijanoza kože prasadi kao znak respiratornih bolesti

Izvor: arhiv fotografija autorice

Najznačajniji nalaz bio je utvrđen na plućima. Pluća su bila voluminozna, nekolabirana i mesnate konzistencije. Jasno su bila vidljiva krvarenja u parenhimu koja su varirala od točkasti do difuznih. Na pojedinim plućima bio je jasno vidljiv blagi do osrednji interlobarni edem, a na nekima su bili vidljivi subpleuralni emfizemi. Karakter patoloških promjena na dijafragmatskim režnjevima je u pravilu bio sličan dok su kranijalni režnjevi na pojedinim plućima bili s najizraženijim patološkim promjenama pri čemu su upalne promjene bile već u fazi konsolidacije dok se na pojedinim plućima na anteriokranijalnim dijelovima patoanatomske promjene nisu uočavale (slika 10).



Slika 10. Patoanatomske promjene na plućima uslijed infekcije VIS-om

Izvor: arhiv fotografija autorice

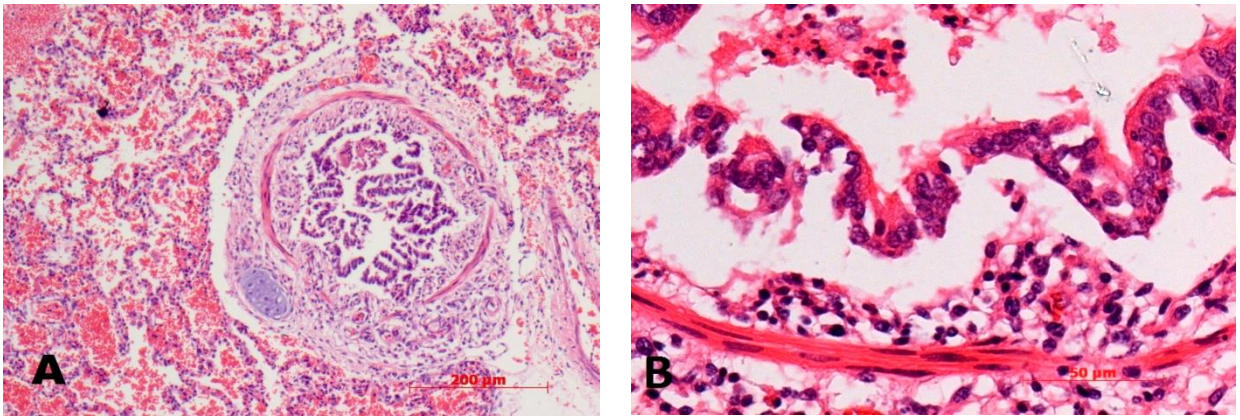
U grudnoj šupljini se nalazila mala do umjerena količina eksudata dok priraslica u pravilu nije bilo osim diskretnih naslaga fibrina na anteriokranijalnim plućnim režnjevima. U svih životinja je utvrđen generalizirani limfadenitis pri čemu su promjene bile najizraženije na medijastinalnim limfnim čvorovima. Dušnik i bronhi bili su u potpunosti ispunjeni pjenušavim sadržajem. Na štitnoj žlijezdi primijećena su snažna točkasta krvarenja (slika 11).

Slika 11. Karakterističan patoanatomski nalaz životinje zaražene VIS-om

Izvor: arhiv fotografija autorice

Patohistološke promjene

Na presjeku pluća uočava se snažna upalna reakcija. Alveolarni prostori potpuno izostaju uslijed čega se ne prepoznaje jasna arhitektura pluća te su u potpunosti ispunjeni mješovitim upalnim stanicama, dominantno limfocitima. U supbronhalnom području je također prisutan limfocitaran prsten. Sluznica bronha je u potpunosti kolabirana i deskvamirana dok je lumen ispunjen staničnim detritusom i upalnim stanicama. U alveolarnim stijenkama uočljiva je jaka punokrvnost (slika 12 A i B).

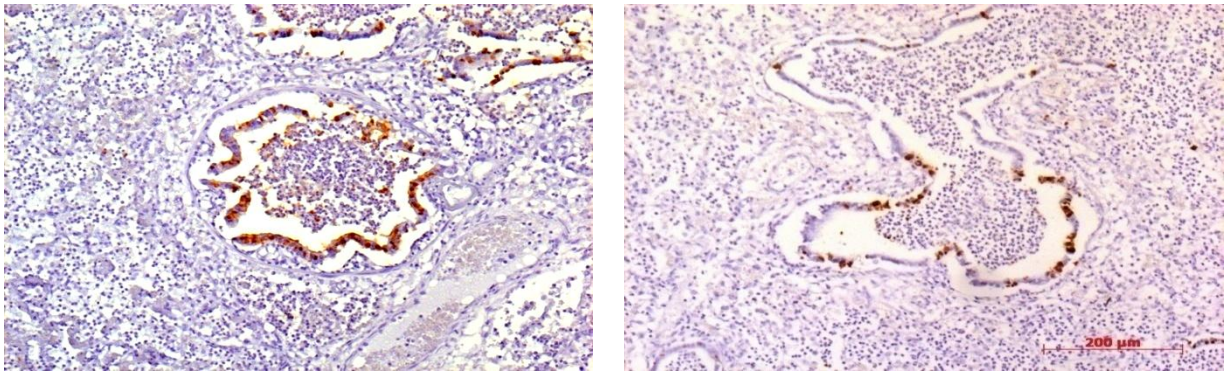


Slika 12 A. Pluća -presjek parenhima i većeg bronha. Povećanje 10 x. Slika **12 B.** Pluća – presjek sluznice bronha. Bojanje H&E. Povećanje 40x.

5.3. Dokaz antigena imunohistokemijskim postupkom (IHK)

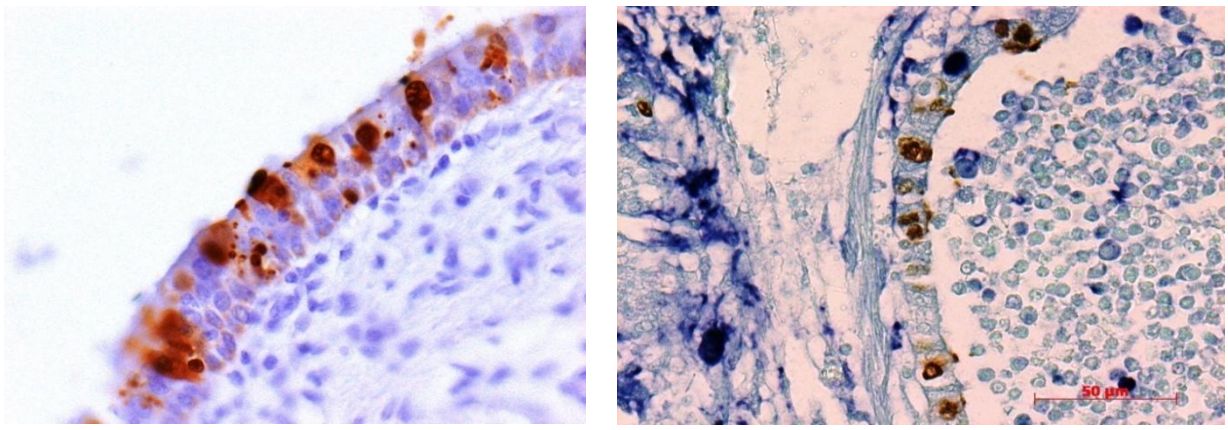
Metodom imunohistokemije pretraženo je 28 uzoraka tkiva pluća na prisutnost VIS. Od toga je 14 uzoraka tkiva pluća odbijene prasadi težine 20-28 kg bilo s farme F14 u Vukovarsko-srijemskoj županiji. U njih 5 metodom IHK utvrđen je antigen VIS. S farme F13, također iz Vukovarsko-srijemske županije pretraženo je ukupno 9 uzoraka pluća prasadi u dobi od 4-6 tjedana od kojih su 3 uzorka bila pozitivna na antigen VIS. Iz dvorišnog uzgoja u Brodsko-posavskoj županiji pretraženo je su 5 uzoraka tkiva pluća prasadi u dobi od 9-12 tjedana, te je u jednom utvrđen antigen VIS.

Imunohistokemijski je utvrđeno da je virusni antigen dominantno prisutan u cilijarnom epitelu bronha pri čemu je u većini stanica utvrđena infekcija. Premda su u ostalim histološkim strukturama utvrđene snažne histopatološke promjene, ipak je nalaz virusnog antigena sporadičan, tek u pojedinim i vrlo rijetkim pneumocitima. Količina i distribucija virusnog antigena u stanicama cilijarnog epitela bila je različita. U pojedinim stanicama ustanovljena je snažna prisutnost antigena i u jezgri i citoplazmi, dok je u drugima dominantno u jezgri i tek pojedine sitne točkice u citoplazmi ili samo citoplazmi dok se jezgra uopće ne raspoznaje. Ovakav nalaz je u korelaciji s fazama replikacije virusa i posljedičnim citopatogenim učinkom virusa čime možemo pratiti različite faze infekcije *in situ* (slike 13 i 14). Svi pretraženi uzorci u kojima je dokazan VIS pretraženi su molekularnim metodama i rezultati su bili identični.



Slika 13. Fotografije prikazuju presjek parenhima pluća i bronhiola. Na presjeku se jasno uočava izostanak većih zračnih područja karakterističnih za normalnu arhitekturu pluća zbog snažne proliferacije alveolarnih stijenki i infiltracije mješovitog upalnog infiltrata. Mukoza bronha se odvaja i u velikom broju stanica se uočavaju različiti stadiji apoptoze uz prisutnost virusnog antigena. Lumen bronhiola ispunjen je staničnim detritusom i mješovitim upalnim infiltratom. IHC anti-H1N1/H3N2, DAB kromogen, diferencijalno obojeno s Mayerovim Hematoksilinom, 10x.

Izvor: arhiv fotografija autorice



Slika 14. Tkivo pluća. Presjek sluznice bronhiola. 40x. IHC anti SIV H1N1/H3N2, DAB kromogen, diferencijalno bojeno Mayerovim hematoksilinom.

Izvor: arhiv fotografija autorice

5.4. Rezultati pretraga molekularnim metodama

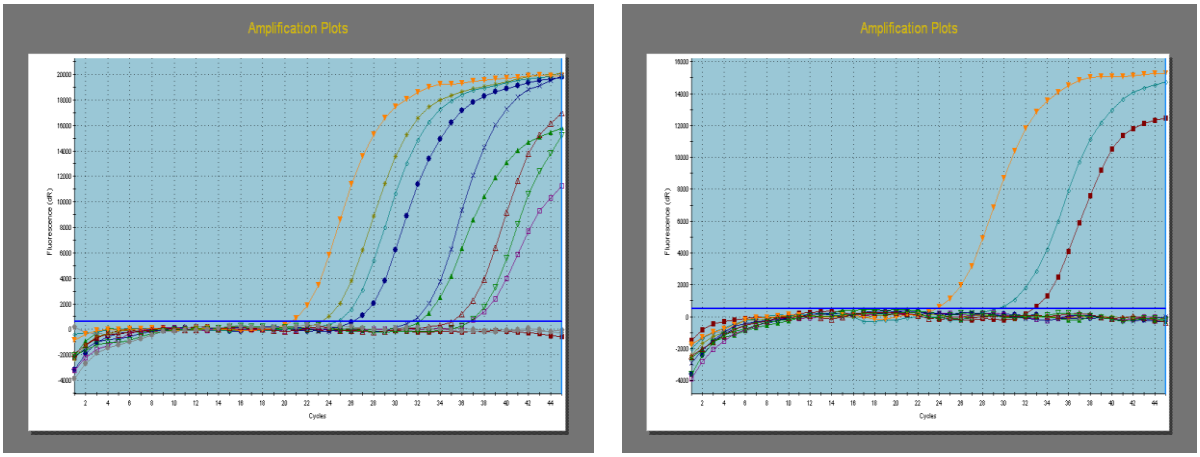
Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu dokazan je gen M VIS u pretraživanim kliničkim uzorcima. Od ukupno 142 pretražena uzorka pluća, gen M bio je dokazan u 9 uzoraka plućnog tkiva. Gen M VIS A također je bio dokazan u 7 od 29 ukupno pretraženih nazofaringealnih obrisaka (tablice 29 i 30).

Tablica 29. Broj ukupno pretraženih uzoraka nazofaringealnih obrisaka i broj uzoraka u kojima je dokazan gen M virusa influence svinja po županijama

Županija	Uzgoj	Ukupno pretraženo obrisaka	Dobna kategorija	Oznake uzoraka	Ct vrijednosti
Vukovarsko-srijemska	F14	10	Krmače	B1-10/2012	0
		10	Prasad 6-11 tjedana	B11-20/2012	0
	F13	9	Prasad 4-6 tjedana	1/2016	**26,82**
				2/2016	**32,71**
				3/2016	**23,96**
				4/2016	**37,46**
				5/2016	**32,10**
				6/2016	**35,74**
				7/2016	**37,24**
				8/2016	0
				9/2016	0
Ukupno:		**29**			**7 pozitivnih**

Tablica 30. Broj ukupno pretraženih uzoraka pluća i broj uzoraka u kojima je dokazan gen M virusa influence svinja po županijama

Županija	Uzgoj	Ukupno pretraženo uzoraka pluća	Dobna kategorija	Oznakeuzoraka	Ct vrijednosti
Brodsko-posavska	dvorišni	3	Prasad 10-12 tjedana	2209/1-3/2014	0
	dvorišni	2	Prasad 10-12 tjedana	631/2/2015	0
				631/3/2015	**28,61**
	dvorišni	3	Prasad 9-12 tjedana	P1-3/2015	0
Varaždinska	dvorišni	4	Prasad 4-10 tjedana	972/1-4/2014	0
Vukovarsko-srijemska	F14	4	Prasad 9-14 tjedana	2319/1/2011	0
				2319/2/2011	**24,40**
				2319/3/2011	**30,26**
				2319/4/2011	**19,32**
		5	Prasad 9-14 tjedana	1600/1/2012	**38,41**
				1600/9/2012	**23,12**
				1600/1,3,10/2012	0
		7	Prasad 4-10 tjedana	331/1-7/2016	0
	F13	3	Prasad 4-6 tjedana	1954/1-3/2013	0
		3	Prasad 3 tjedna	PPA1-3/2014	0
		6	Odbita prasad	PA1-6/2015	0
		3	Prasad 4 tjedna	PA7-9/2015	0
		3	Prasad 4-6 tjedana	853/1-3/2016	0
		5	Prasad 4-10 tjedana	854/1/2016	**16,94**
				854/5/2016	**22,94**
				854/2,3,4/2016	0
		4	Prasad 4-10 tjedana	855/1-3/2016	0
				855/4/2016	**32,28**
	F18	3	Prasad 9-12 tjedana	2571/1-3/2013	0
Zagrebačka	Klaonica	72	Tovljenici 150-200 kg	1-72/2015	0
	F16	4	Prasad 6-11 tjedana	2500/1-4/2012	0
		6	Prasad 6-11 tjedana	2318/1-6/2013	0
		1	Prase oko 10 tjedana	1002/2014	0
		1	Prase oko 4 tjedna	PP/2015	0
Ukupno:		**142**			**9 pozitivnih**

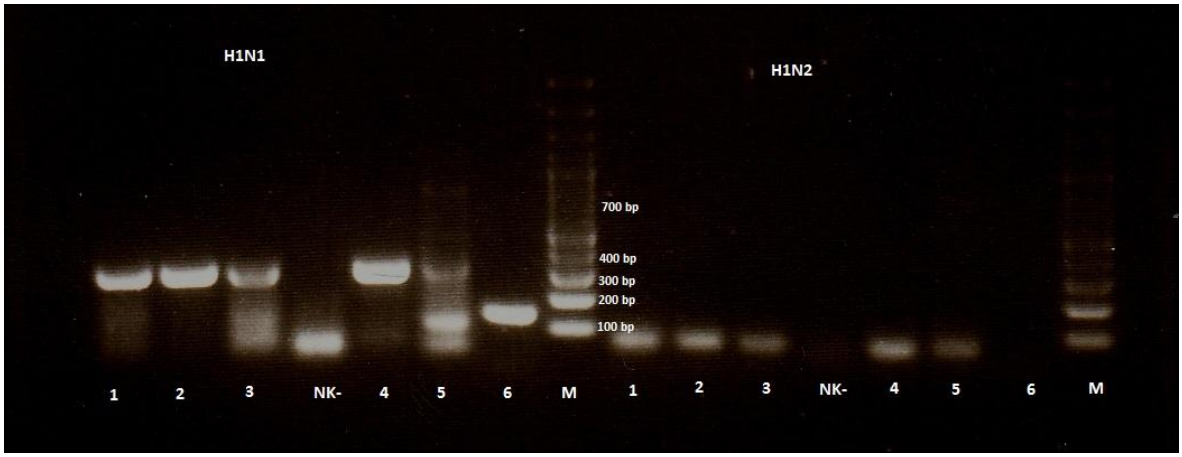


Slika 15. Reprezentativnan prikaz rezultata u vidu amplifikacijskih krivulja dobivenih lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu na uređajuMx3005P (Stratagene)

Izvor: arhiv fotografija autorice

Metodom RT- PCR dokazali smo ciljane odsječke gena HA i NA u jednom uzorku pluća praseta dobi oko 10-12 tjedana držanom u dvorišnom uzgoju u Brodsko-posavskoj županiji, uvezenom iz Nizozemske oznake 631/3/2015 (u daljnjem tekstu oznake 631/2015). Zatim u trima uzorcima pluća prasadi stare 4-10 tjedana podrijetlom iz farmskog uzgoja F13 u Vukovarsko-srijemskoj županiji oznaka 854/5/2016 (u daljnjem tekstu 854/2016) i 855/4/2016 (u daljnjem tekstu 854/2016) te u 3 uzorka nazofaringealnih obrisaka prasadi starosti 4-6 tjedana (oznake 1/2016, 3/2016 i 5/2016), također podrijetlom s farme F13 u Vukovarsko-srijemskoj županiji. U dva uzorka pluća iz iste županije, podrijetlom s farme F14 oznaka 2319/4/2011(nadalje 2319i i 2319K/2011) i 1600/9/2012 (nadalje označenom 1600/2012) amplificirani su cijeli geni HA i NA.

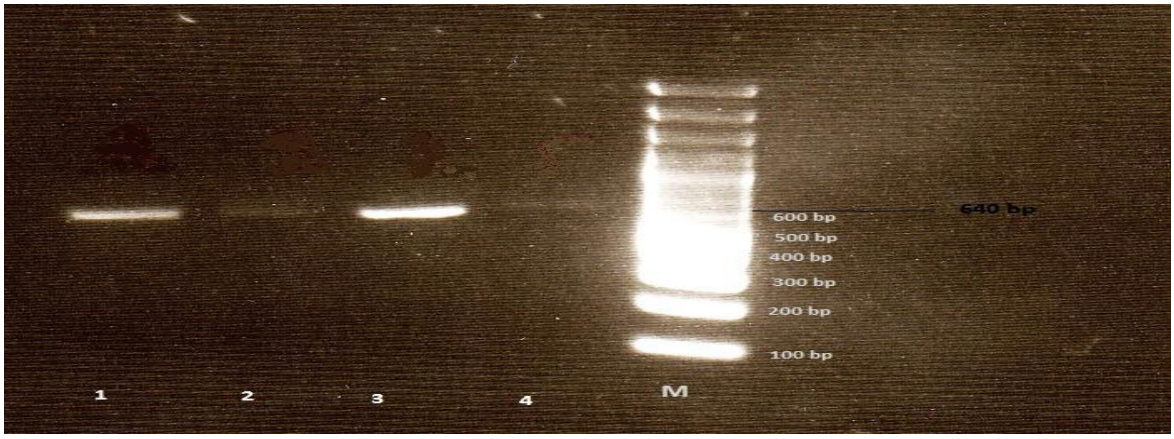
Primjer rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena HA u 1,5%-tnom agaroznom gelu dobivenih metodom opisanom u radu CHIAPPONI i sur. (2012) prikazani su na slici 16. Dobiveni odsječci veličine su 327 bp, a umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju uz uporabu para početnica H1N1-F/H1N1-R (H1 av-like). U istim uzorcima nije umnožen dio slijeda gena HA očekivane veličine 241 bp (H1N2).



Slika 16. Prikaz dijela rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena HA u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Dobiveni odsječci veličine su 327 bp, početnice prema radu (CHIAPPONI, i sur., 2012.). M-standard za određivanje molekularne mase (100bp DNA Ladder, Invitrogen, SAD). Oznake uzoraka: 1=1/2016, 2=3/2016, 3=5/2016, 4=2319i/2011 (PK+), 5=854/2016, 6=855/2016

Izvor: arhiv fotografija autorice

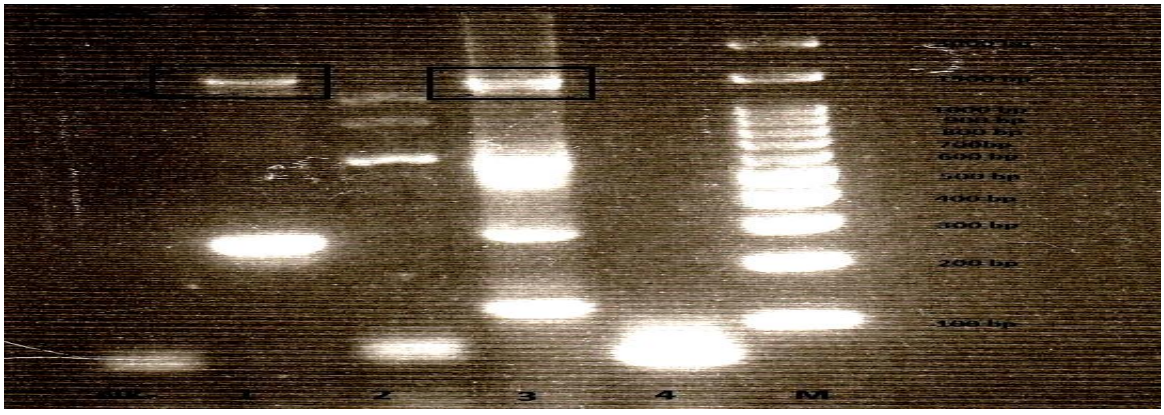
Na slici 17. prikazan je rezultat elektroforeze umnoženih ciljnih odsječaka HA2 regije gena HA veličine 640 bp u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Odsječci su umnoženi metodom RT-PCR uz uporabu para početnica HA-1134-F i Bm-NS-890 R opisanim u radu PHIPPS i sur. (2004).



Slika 17. Prikaz dijela rezultata elektroforeze umnoženih ciljnih odsječaka gena HA veličine 640 bp u 1,5%-tnom agaroznom gelu. M-standard za određivanje molekularne mase (100bp). Oznake uzoraka: 1=1/2016, 2=2/2016, 3=3/2016, 4=4/2016

Izvor: arhiv fotografija autorice

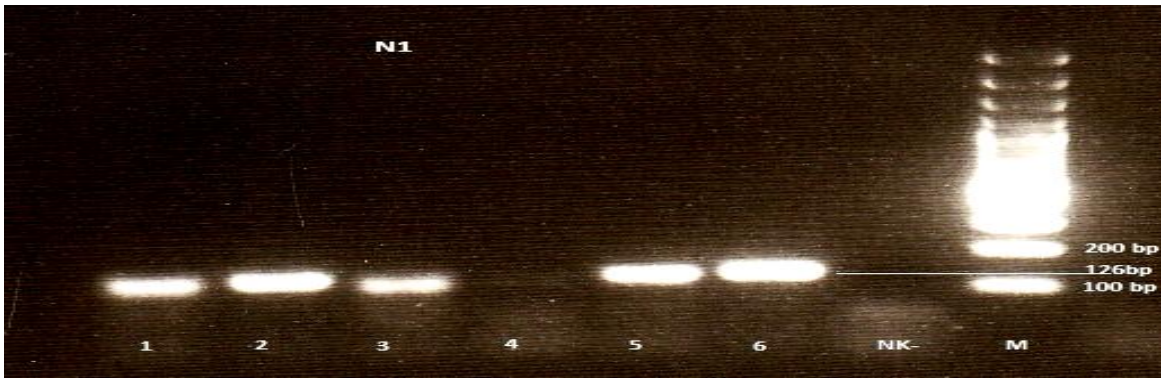
Cijeli gen NA umnožen je metodom RT- PCR uz uporabu para početnica Ba-NA-1 i Ba-NA-1413r (HOFFMANN, i sur., 2001.). Na Slici 18. prikazani su rezultati elektroforeze umnoženog gena NA u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Očekivana veličina PCR produkta je 1413 bp.



Slika 18. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena NA u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Očekivana veličina PCR produkta je 1413 bp. M je standard za određivanje molekularne mase (Take5 ™100bp DNA Ladder, highQu GmbH, Njemačka).Oznake uzoraka: 1=2319i/2011, 2=2319K/2011, 3=1600/2012, 4=854/1/2016

Izvor: arhiv fotografija autorice

Metodom RT-PCR opisanom u radu FEREIDOUNI i sur. (2009) uz par početnica N1-F i N1-R umnožili smo ciljni odsječak gena NA veličine 126 bp (slika 19).



Slika 19. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena NA veličine 126 bp u 1,5%-tnom agaroznom gelu. M-standard za određivanje molekularne mase (100bp DNA Ladder, Invitrogen, SAD).Oznake uzoraka: 1=1/2016, 2=3/2016, 3=854/2016, 4=631/2016, 5=1600/2012, 6=2319/2011 (PK+)

Izvor: arhiv fotografija autorice

Ciljni odsječak gena NA veličine 514 bp umnožen metodom RT- PCR uz uporabu para početnica N1-FOR i N1-REV opisanih u radu CHIAPPONI i sur. (2012) prikazan je na slici 20.

Slika 20. Prikaz rezultata elektroforeze umnoženih odsječaka gena NA veličine 514 bp u 1,5%-tnom agaroznom gelu. M-standard za određivanje molekularne mase (100bp DNA Ladder, Invitrogen, SAD). Oznake uzoraka: 1=1/2016, 2=3/2016, 3=5/2016, 4=631/2015, 5=854/2016, 6=2319/2011 (PK+)

Izvor: arhiv fotografija autorice

Gen HA

Obzirom na različite kodirajuće regije i veličine analiziranih odsječaka HA gena, izradili smo dva odvojena filogenetska stabla.

Vjerodostojnost dobivenog grupiranja na izrađenom filogenetskom stablu za HA1 kodirajuću regiju gena HA (slika 21.) potvrđena je vrlo visokim vrijednostima postignutima metodom samoučitavanja. Najniža postignuta vrijednost pouzdanosti prikazanog grupiranja iznosila je 92% za podtip H1N2. Sve hrvatske sekvencije grupiralesu se unutar filogenetske skupine H1N1, a sekvencije izolata iz 2016. godine međusobno se razlikuju u 2 do 8 nt unutar 339 nukleotidne regije. Razlika sa sekvencijom izolata iz 2011. godine je 25 do 29 nt unutar 339 nt regije. Utvrđena je sličnost, čak 84,6%, A/swine/Croatia/2391i/2011 sa svinjskim izolatom podrijetlom iz Danske (A/swine/Denmark/10790-2/2010). Sličnost hrvatskih izolata 854, 1, 3, i 5/2016. s referentnim izolatom A/swine/Gent132/2005 iznosila je čak 93,5 do 95,3 %.

Dobiveno grupiranje na izrađenom filogenetskom stablu za HA2 kodirajuću regiju gena HA (slika 22.) potvrđeno je vrlo visokim vrijednostima postignutima metodom samoučitavanja. Najniža postignuta vrijednost pouzdanosti prikazanog grupiranja iznosila je 46% za podtip H1N2. I ovom filogenetskom analizom su se sekvencije grupirale unutar filogenetske skupine H1N1. Sekvencije uzoraka 2319/2011 i 1600/2012 međusobno se razlikuju u 4 nt unutar 351 nukleotidne regije. Vrlo velika sličnost od 98,9% utvrđena je s izolatom A/swine/Brno/00/2000 te sa svinjskim izolatima podrijetlom iz Danske A/swine/Denmark/10404-1/2005 (97,7%) i A/swine/Denmark/101875-1/2010 (94,9%). A/swine/Croatia/631/2015 najsličniji je izolatu podrijetlom iz Nizozemske A/swine/Netherland/Neerkant174/2011 (95,2%), zatim A/swine/Croatia/854/2016 Njemačkom izolatu A/swine/Ennigerloh/IDT5803/2006 (94,9%) te A/swine/Croatia/855/2016 izolatu A/swine/Gent/132/2005 (80,1%).

Gen NA

Filogenetskom analizom umnoženih odsječaka gena NA (slika 23.) hrvatske sekvencije su se grupirale unutar filogenetske skupine H1N1. Umnožena su dva cijela gena NA, međutim s obzirom na veličinu ostalih odsječaka gena koje smo dokazali, navedene sekvencije smo skratili nakon poravnavanja na veličinu od 535 nt kako bi rezultati bili prikazani u jednom filogenetskom stablu. Sekvencije hrvatskih izolata izdvojenih u 2011. i 2012. godini prikazuju vrlo veliku sličnost (98,9%) te se razlikuju u samo 6 nt unutar 535 nukleotidne regije. Velika je sličnost navedenih hrvatskih izolata s danskim izolatima A/swine/Denmark/103485-1/2007 (95,7%), A/swine/Denmark/10790-2/2010 (94,9%) i A/swine/Denmark/10404-1/2005 (91,2%). Hrvatski izolati iz 2016. međusobno se razlikuju u 15 nt unutar 535 nt regije. Najsličniji su prije spomenutom danskom izolatu A/swine/Denmark/10404-1/2005 (91,03-92,4%). Usporedbe radi, u filogenetsku analizu je uključen i izolat podrijetlom od divlje patke A/mallard/Netherlands/5/2013 koji se razlikuje u 67 od 535 nt te je sličnost sa genom NA svinjskih izolata čak 87,5%.

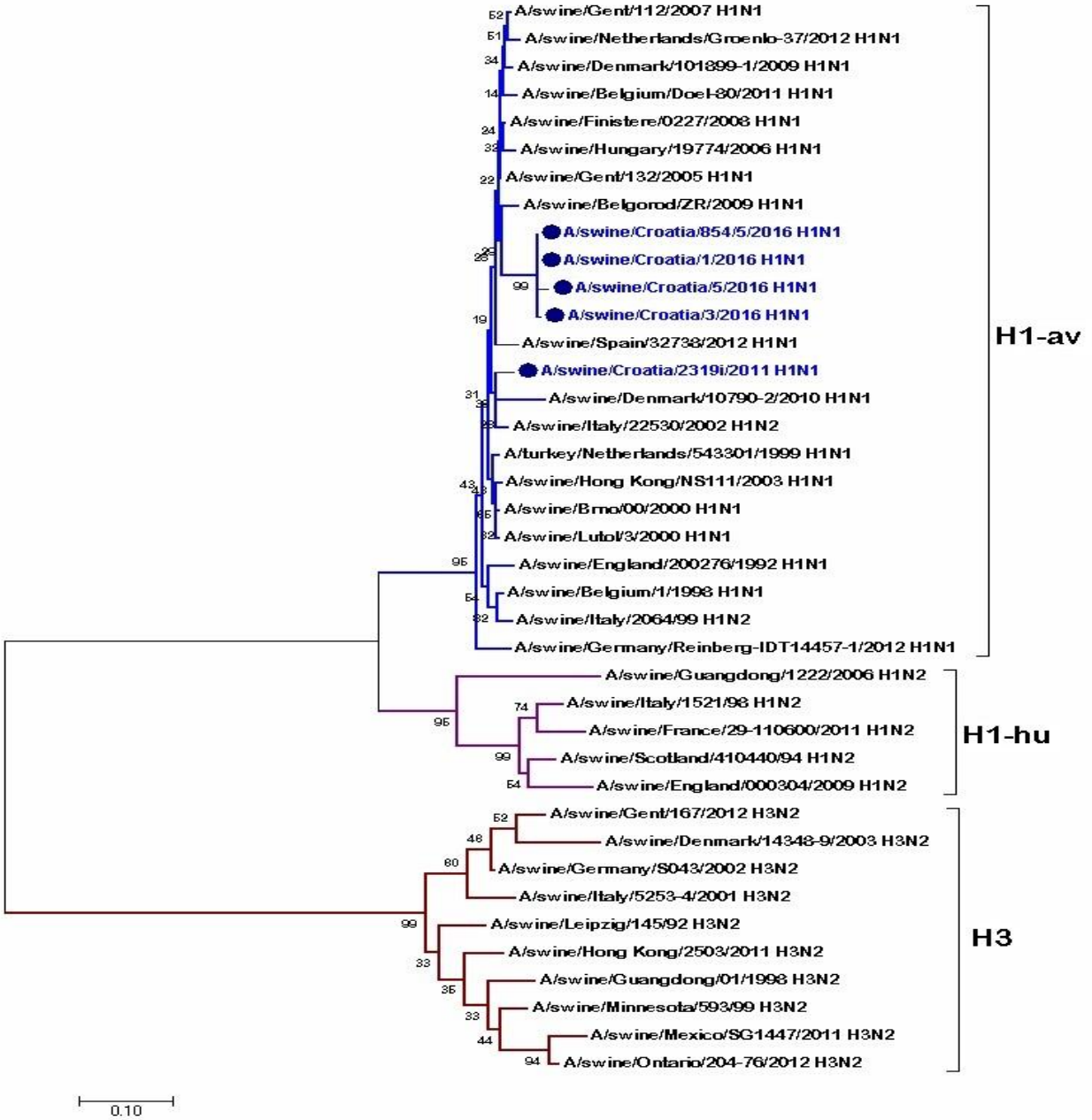
Svi hrvatski izolati pripadaju filogenetskoj skupini euroazijskog svinjskog H1N1 podtipa nalik ptičjem.

Tablica 31. Referentni izolati uključeni u filogenetičku analizu umnoženih odsječaka gena HA i NA VIS.

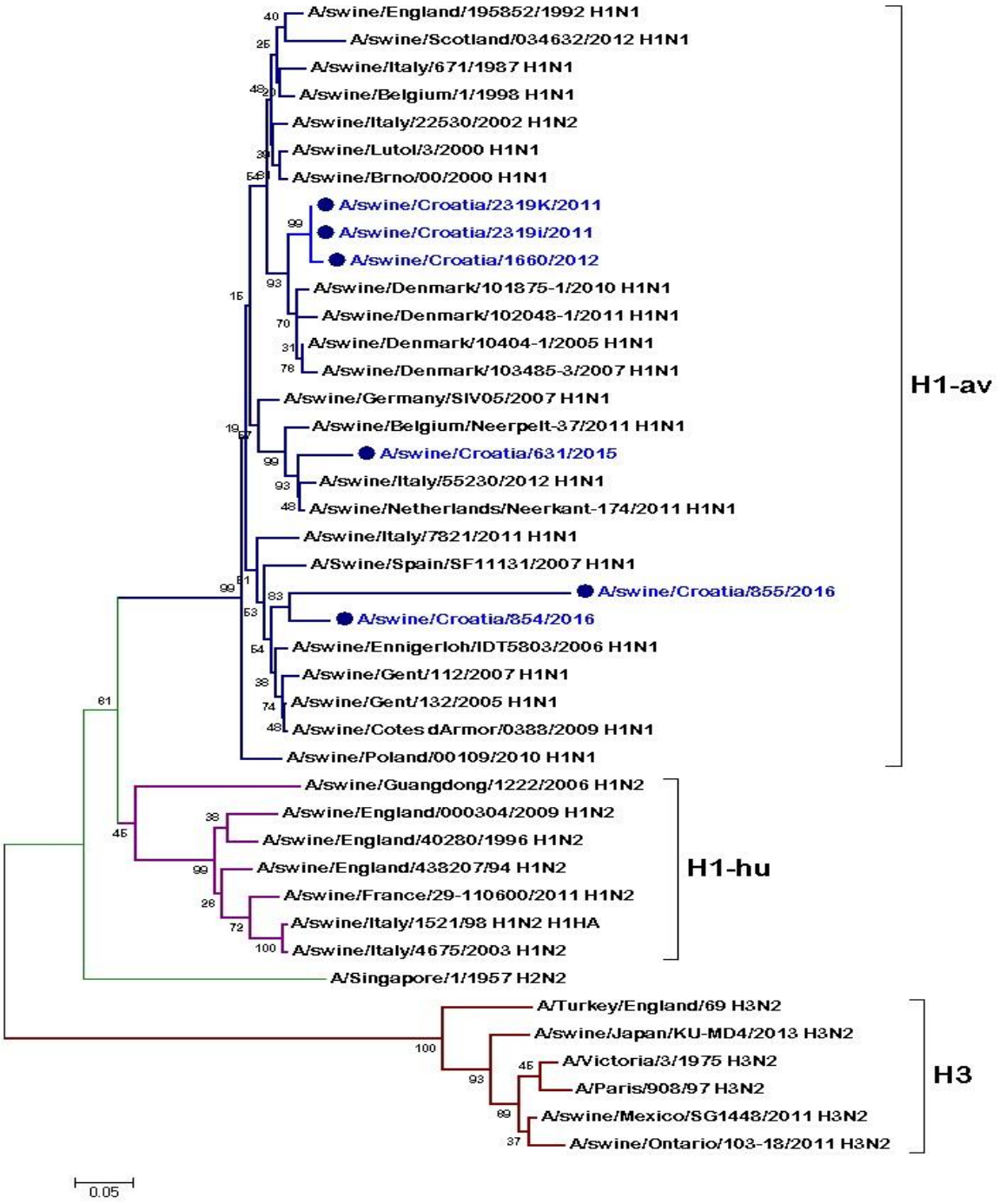
Pristupni broj u genskoj banci	Naziv	Domaćin	Segment	Kodirani protein
HQ658491 1	A/swine/Italy/22530/2002 (H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
HE802061.1	A/turkey/Netherlands/543301/1999 (H1N1)	puran	4/cjelovit	H1
CY116531.1	A/swine/Lutol/3/2000 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
CY115881.1	A/swine/Brno/00/2000 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR699734.1	A/swine/France/CotesdArmor-0275/2010 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
AM920742.1	A/swine/Germany/S043/2002 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
AF251427.2	A/Swine/Minnesota/593/99 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
KJ413913.1	A/swine/Ontario/204-76/2012 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
JQ220544.1	A/swine/Hong Kong/2503/2011 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
CY160228.1	A/swine/Mexico/SG1447/2011 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
CY160230.1			6/cjelovit	N2
KM822630.1	A/swine/Gent/167/2012 (H3N2)	svinja	4/djelomičan	H3
EF409247.1	A/swine/Leipzig/145/92 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
DQ975267.1	A/swine/Italy/5253-4/2001 (H3N2)	svinja	4/djelomičan	H3
FJ830855.1	A/swine/Guangdong/01/1998 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
KC900244.1	A/swine/Denmark/14348-9/2003 (H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
AF085413.1	A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
AJ344012.1	A/swine/Italy/1521/98(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
AJ412701.1			6/cjelovit	N2
AJ344013.1	A/swine/Italy/2064/99(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
CY085550.2	A/swine/Hong_Kong/NS129/2003 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
CY116044.1	A/swine/England/200276/1992 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
CY116434.1	A/swine/Gent/132/2005 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
FJ791280.1	A/swine/Gent/112/2007 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
FJ798777.1	A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
FJ805962.1	A/swine/Belgium/1/1998 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
FN646103.1	A/swine/Finistere/0227/2008 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
JX879783.1	A/swine/Belgorod/ZR/2009 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR066542.1	A/swine/Denmark/101899-1/2009 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
KR066566.1	A/swine/Denmark/10790-2/2010 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR066614.1		svinja	6/cjelovit	N1
KR699908.1	A/swine/Netherlands/Groenlo-37/2012 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR699964.1	A/swine/Belgium/Doel-80/2011 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700185.1	A/swine/Spain/32738/2012 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700366.1	A/swine/Germany/Reinberg-IDT14457-1/2012	svinja	4/cjelovit	H1
CY116036.1	A/swine/England/195852/1992 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
CY022986.1	A/swine/Italy/671/1987 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700727.1	A/swine/Scotland/034632/2012 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
DQ100427.1	A/swine/Belzig/2/2001 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
CY115881.1	A/swine/Brno/00/2000 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1

KR066567.1	A/swine/Denmark/101875-1/2010 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
KR066568.1	A/swine/Denmark/102048-1/2011 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
KC900281.1	A/swine/Denmark/10404-1/2005 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	N1
KR066616.1			6/djelomičan	N1
KR066565.1	A/swine/Denmark/103485-3/2007 (H1N1)	svinja	4/djelomičan	H1
FN429080.1	A/swine/Germany/SIV05/2007 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700028.1	A/swine/Belgium/Neerpelt-37/2011 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KC984937.1	A/swine/Italy/55230/2012 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700004.1	A/swine/Netherlands/Neerkant-174/2011 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
HF674888.1	A/swine/Spain/SF11131/2007 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
GQ161139.1	A/swine/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KC881265.1	A/swine/Cotes d'Armor/0388/2009 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700485.1	A/swine/Poland/00109/2010 (H1N1)	svinja	4/cjelovit	H1
GU086081.1	A/swine/Guangdong/1222/2006(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
KR700648.1	A/swine/England/000304/2009(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
CY116159.1	A/swine/England/40280/1996(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
AF085414.1	A/swine/England/438207/94(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
KJ128325.1	A/swine/France/29-110600/2011(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
HM996942.1	A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)	svinja	4/cjelovit	H1
L11142.1	A/Singapore/1/57 (H2N2)	čovjek	4/cjelovit	H2
AY531037.1	A/turkey/England/69 (H3N2)	puran	4/cjelovit	H3
KM596711.1	A/swine/Japan/KU-MD4/2013(H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
KJ413895.1	A/swine/Ontario/103-18/2011(H3N2)	svinja	4/cjelovit	H3
KJ413863.1			6/cjelovit	N2
KR066615.1	A/swine/Denmark/103485-1/2007 (H1N1)	svinja	6/cjelovit	N1
JX879789.1	A/swine/Tatarstan/KB/2009 (H1N1)	svinja	6/cjelovit	N1
CY010574.2	A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1)	svinja	6/cjelovit	N1
EU045384.1	A/swine/Italy/4230/2002 (H1N1)	svinja	6/djelomičan	N1
GQ161121.1	A/swine/Haseluenne/IDT2617/2003 (H1N1)	svinja	6/cjelovit	N1
KR700817.1	A/swine/Belgium/Deinze-393/2012 (H1N1)	svinja	6/cjelovit	N1
KR862596.1	A/mallard/Netherlands/5/2013 (H1N1)	divlja	6/djelomičan	N1
KF041830.1	A/Acre/117691/2012 (H3N2)	čovjek	6/djelomičan	N2
KM596712.1	A/swine/Japan/KU-MD4/2013 (H3N2)	svinja	6/cjelovit	N2
GU086083.1	A/swine/Guangdong/1222/2006 (H1N2)	svinja	6/cjelovit	N2
HM996957.1	A/swine/Italy/4675/2003 (H1N2)	svinja	6/cjelovit	N2
AY590827.1	A/swine/Gent/1/1984 (H3N2)	svinja	6/djelomičan	N2
KC142128.1	A/swine/Gent/172/2008 (H3N2)	svinja	6/djelomičan	N2
KR066641.1	A/swine/Denmark/10779-2/2012 (H1N2)	svinja	6/cjelovit	N2
KR700650.1	A/swine/England/000304/2009 (H1N2)	svinja	6/cjelovit	N2
CY116161.1	A/swine/England/40280/1996 (H1N2)	svinja	6/cjelovit	N2

Gen HA

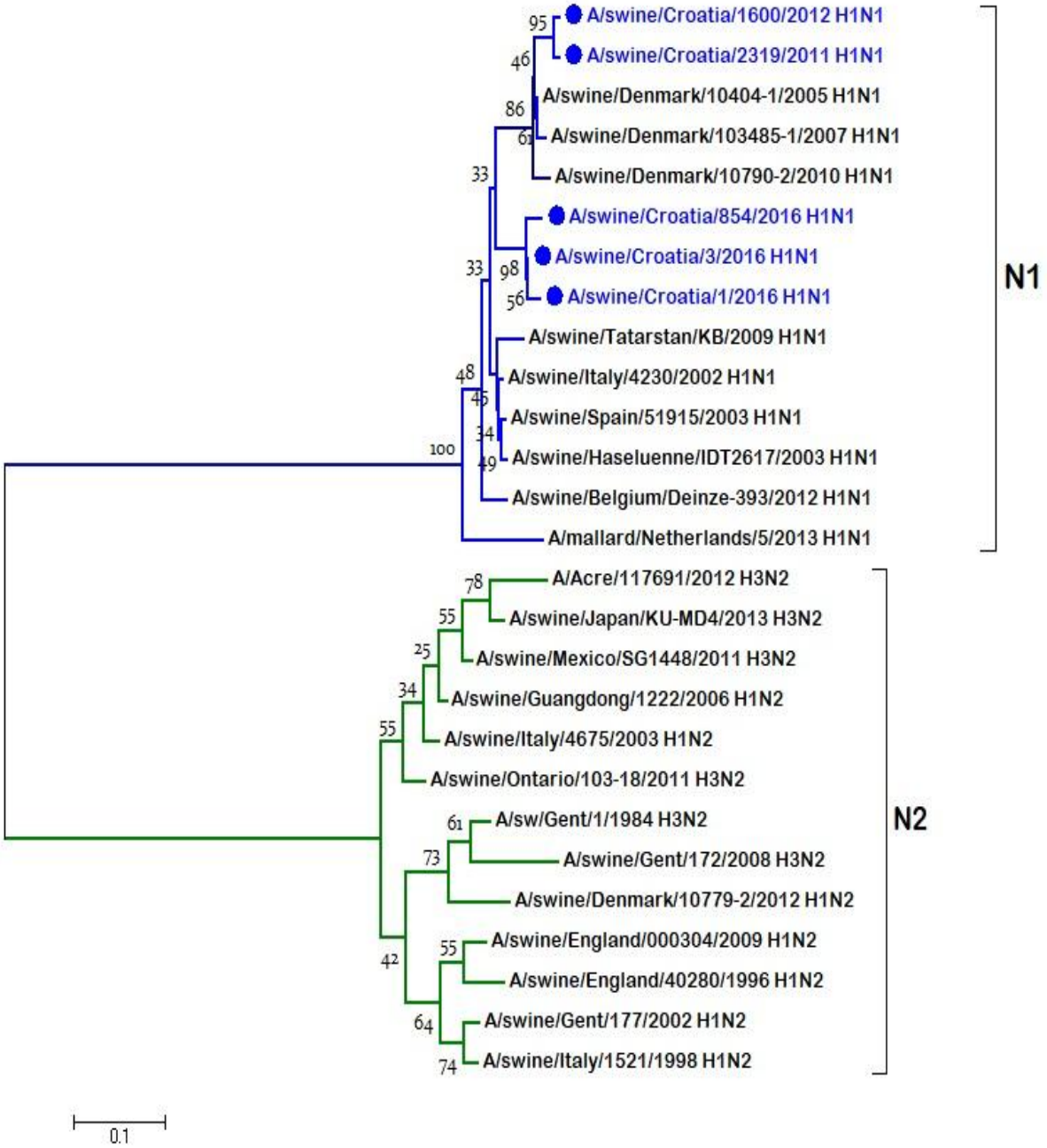


Slika 21. Filogenetsko stablo dobiveno analizom inačica odsječka HA1 kodirajuće regije HA gena VISnavedenih u tablici 31. Analiza je provedena metodom susjednog sparivanja uz primjenu modela *Kimura-2 Parameter*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetsku udaljenost (d=0,1). Hrvatski izolati označeni su plavom bojom i točkom; referentni izolati označeni su podebljanom crnom bojom. H1-av označuje H1 nalik ptičjem ,a H1-hu nalik ljudskom H1.



Slika 22. Filogenetsko stablo dobiveno analizom inačica odsječka HA2 kodirajuće regije HA gena VIS navedenih u tablici 31. Analiza je provedena metodom susjednog sparivanja uz primjenu modela *Kimura-2 Parameter*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetsku udaljenost (d=0,05). Hrvatski izolati označeni su plavom bojom i točkom; referentni izolati označeni su podebljanom crnom bojom. H1-av označuje H1 nalik ptičjem a H1-hu nalik ljudskom H1.

Gen NA

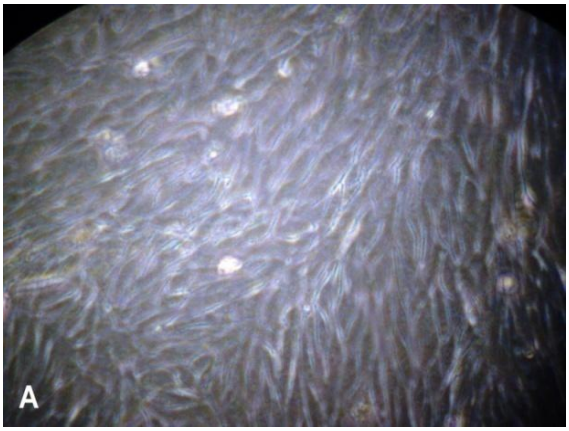


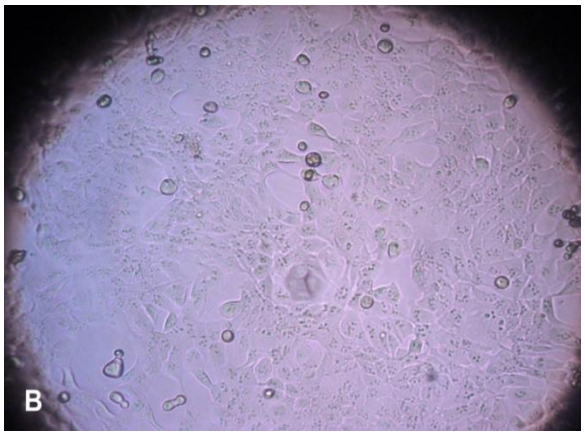
Slika 23. Filogenetsko stablo dobiveno analizom inačica odsječaka NA gena VISnavedenih u tablici 31. Analiza je provedena metodom susjednog sparivanja uz primjenu modela *Kimura-2 Parameter*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetičku udaljenost (d=0,1). Hrvatski izolati označeni su plavom bojom i točkom; referentni izolati označeni su podebljanom crnom bojom.

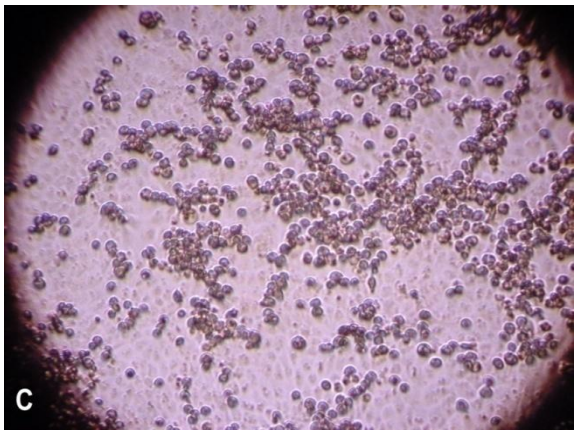
5.5. Rezultati izdvajanja virusa influence svinja na MDCK staničnoj kulturi

Uzorke obrisaka nazofarinksa i pluća svinja iz farmskih uzgoja u Vukovarsko-srijemskoj županiji (F13 i F14) i dvorišnog uzgoja u Brodsko-posavskoj županiji, nacijepili smo na linijsku staničnu kulturu (MDCK), nakon što su prethodno polučili pozitivan rezultat umnažanja odsječka gena M virusa influence A metodom PCR u stvarnom vremenu.

Prilikom provođenja postupka izdvajanja svakodnevo smo pratili promjene na stanicama u obliku citopatogenog učinka (slike 24 B i C). Ukupno su napravljene tri pasaže, a nadtalog svake pasaže nakon odmrzavanja koristili smo za provjeru uspješnosti umnažanja virusa u kulturama stanica metodom PCR u stvarnom vremenu. Ako su Ct vrijednosti (engl.cycle treshold, granična vrijednost broja ciklusa) nakon pasaže bile značajno manje u odnosu na provjeru prije izdvajanja virusa, tada smo smatrali umnažanje virusa uspješnim (slika 25.).



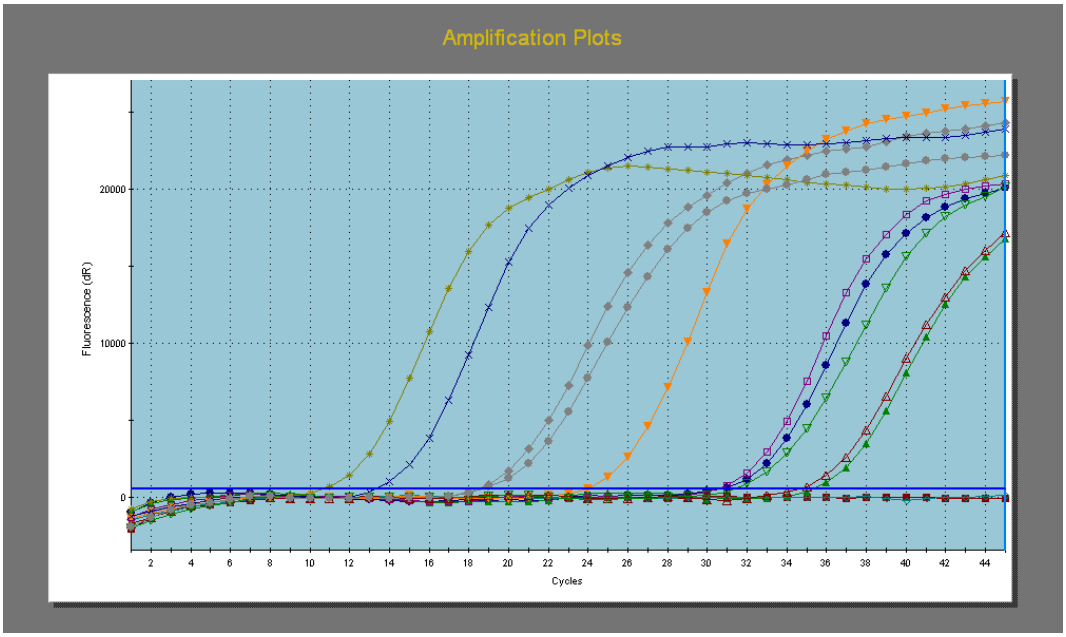




Slika 24.A. MDCK, negativna kontrola, 10x; **B**. CPU, 1. dan nakon inokulacije virusa; 10x;

C. CPU, 3. dan nakon inokulacije virusa; 10x

Izvor: arhiv fotografija autorice



Slika 25. Provjera umnažanja virusa na MDCK stanicama metodom Real time RT-PCR za gen M VIS. U tablici ispod slike prikazane su Ct vrijednosti prije izdvajanja virusa i nakon umnažanja VIS na MDCK stanicama. Podebljano su označeni uzorci i pripadajuće Ct vrijednosti iz kojih smo izdvojili VIS.

Oznaka uzorka	Ct vrijednost prije inokulacije	Ct vrijednost nakon 2. pasaže
2319/2/2011	29,12	-
2319/3/2011	32,74	-
2319/4/2011	**23,78**	**12,67**
1/2016	26,82	26,06
2/2016	32,71	-
3/2016	23,96	28,61
4/2016	37,46	-
5/2016	32,10	-
6/2016	35,74	-
7/2016	37,24	-
631/3/2015	**28,61**	**9,58**

5.6. Rezultati izdvajanja virusa influence svinja na kokošjim embrijima

Uzorke obrisaka nazofarinksa i pluća svinja iz farmskih uzgoja u Vukovarsko-srijemskoj županiji (F13 i F14) podvrgnuli smo izdvajanju i u kokošjim embrijima nakon što su prethodno polučili pozitivan rezultat umnažanja odsječka gena M virusa influence A metodom PCR u

stvarnom vremenu. Alantoisna tekućina iz kokošjeg embrija koji je inokuliran uzorkom pluća 2319/4/2011 je pokazala svojstvo aglutinacije 10%-tnih eritrocita pijetla, dok alantoisne tekućine kokošjih embrija inokuliranih ostalim uzorcima nisu pokazale ovo svojstvo. Titracijom alatoisne tekućine uzorka 2319/4/2011 dobivena je aglutinacija 1%-tnih eritrocita u najvećem razrijeđenu od 1/32 tj. HA titar je iznosio 32.

Serotipizacijom 4 HA jedinice ove alantoisne tekućine dobivena je IHA serumom H1N1 u najvećem razrjeđenju seruma od 1/64, dok serum H3N2 nije pokazao svojstvo IHA čime je potvrđen H1 podtip izdvojenog virusa iz uzorka pluća s oznakom 2319/4/2011.

6. RASPRAVA

Cilj ove disertacije bio je istražiti prisutnost virusa influence svinja u populaciji svinja u velikim komercijalnim uzgojima i obiteljskim gospodarstvima u Republici Hrvatskoj. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2011. do 2016. godine.

Virusi influence tip A (VIA) važni su uzročnici influence u životinja i ljudi te imaju veliko značenje kako na zdravlje životinja, tako i u javnom zdravstvu. Virusna RNA sastoji se od 8 segmenata koji kodiraju 11 proteina, a na osnovi površinskih antigena hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA), dijele se na podtipove. Za VIA je karakteristično da su skloni promjenama antigenske strukture koja se prikazuje kao antigensko skretanje (engl. drift) i antigenska izmjena (engl. shift). Kako su svinje glavni rezervoari VIA te istovremeno mogu biti zaražene virusima influence podrijetlom od ptica i ljudi, imaju važnu ulogu u prijenosu VIA među vrstama (CDC, 2014.).

Kako su u RH do sada provedena serološka istraživanja influence na manjem broju svinja, cilj nam je bio prikazati rasprostranjenost pojedinih podtipova virusa kroz prikaz distribucije protutijela u pojedinim županijama, gledajući cijeli uzgoj i dobne skupine posebno. Pretražene su životinje koje su pokazivale kliničke znakove respiratorne infekcije ali, isto tako i životinje koje nisu pokazivale znakove bolesti. Njihov status protutijela ispitali smo primjenom komercijalnih imunoenzimnih testova i inhibicijom hemaglutinacije koristeći nekoliko različitih antigenaVIS koji kruže u Europi.

Dokazano je da komercijalni ELISA testovi koje smo koristili u ovom istraživanju i za određivanje podtipova H1N1 i H3N2 (IDEXX, Biovet) imaju slabu osjetljivost ako se koriste za određivanje protutijela za navedene podtipove virusa u eksperimentalno inficiranih svinja ili svinja vakciniranih euroazijskim nalik-ptičjim svinjskim virusima influence (BARBE i sur., 2009.)

Za određivanje seroprevalencije rabili smo kompetitivni ELISA test za utvrđivanje protutijela za nukleoprotein (NP) VIS. Navedenim testom moguće je odrediti protutijela za sve podtipove VI tip A i njegove antigenske inačice zahvaljujući monoklonskim protutijelima za očuvane epitope nukleoproteina VIA. Budući da se ovim tipom ELISA testova utvrđuju protutijela za očuvani (konzervirani) nukleoprotein VIS, moguće je da se metodom IHA neće utvrditi protutijela za podtipove VIS, a istovremeno će isti serumi dati ELISA pozitivnu reakciju. Navedeni imunoenzimni test može se koristiti u seroepidemiološkim istraživanjima influence svinja, jer pozitivni rezultati dokazuju kruženje VI u svinja čak i kada su nam nedostupni lokalni

izolati VIS. Uzorci seruma koji su pokazali pozitivan rezultat ELISA testovima, kasnije se mogu pretražiti IHA testom s reprezentativnim virusnim antigenima kako bi utvrdili podtipove virusa prisutne u određenom geografskom području (TSE i sur., 2012.).

U početku izrade ove disertacije za dokaz specifičnih protutijela za podtipove H1N1 i H3N2 koristili smo komercijalne komplete HerdChek Swine Influenza Virus Antibody Test Kit H1N1 i H3N2 (IDEXX, Westbrook, Maine, SAD), no kako je proizvođač u međuvremenu prestao proizvoditi navede komplete, istraživanje je u manjem omjeru provedeno kompletima Swine Influenza H1N1 i H3N2 Antibody Test Kits (ELISA)- Swinecheck® H1N1/H3N2 (Biovet Inc., Kanada). Testovi oba proizvođača koristili su se u veterinarskim dijagnostičkim laboratorijima u Europi te za potrebe istraživanja seroprevalencije u cijelom svijetu (JUNG i sur., 2002.; VENGUST i sur., 2006.; POLJAK i sur., 2008.) iako su primarno namijenjeni za utvrđivanje protutijela u svinja izloženim sjevernoameričkim podtipovima H1N1 i H3N2 (BARBE i sur., 2009.). Europski i američki VIS H1N1 i H3N2 („divlji“ i vakcinalni) antigenski i genski su vrlo različiti pa se postavljalo pitanje osjetljivosti ovih ELISA testova u određivanju protutijela za europske podtipove VIS.

Dosadašnja istraživanja upućuju na to da se navedenim ELISA testovima nije uspjelo dokazati da li su svinje zaražene suvremenim europskim sojevima VIS ili su vakcinirane komercijalnim europskim vakcinama, posebno ako prethodno nisu bile inficirane. Neočekivani problem pojavio se i s ELISA H3N2 pozitivnim rezultatima jer su ostalim serološkim pretragama (IHA, VNT) dali negativan rezultat. Autori dosadašnjih istraživanja takve nespecifične reakcije nisu mogli objasniti (BARBE i sur., 2009.). Za razliku od ELISA testova, IHA je pokazala odličnu osjetljivost i specifičnost što se može obrazložiti uporabom istih sojeva korištenih u eksperimentalnim infekcijama u studiji. Svinje koje su uzastopno inficirane s 2 ili 3 europska soja VIS, češće su reagirale pozitivno na protutijela za oba podtipa virusa od svinja inficiranih samo jednim sojem (BARBE i sur., 2009.)

Nedostatna osjetljivost komercijalnih ELISA testova prikazana je i u istraživanjima u kojima su se koristili hiperimuni serumi sa visokim titrom hemaglutinacijskih protutijela nakon infekcije podtipom H1N2. U tom slučaju ELISA nije reagirala specifično za podtipove. Iako su se ELISA kompletima za dokazivanje podtipa H3N2 oba proizvođača utvrdili svi podtipovi, uključujući i H1N2, kompetitivnim H1N1 ELISA testom proizvođača Biovet moguće je

razlikovati H1 i H3 ali nije moguće razlikovati antigene inačice podtipova H1N1 i H3N2 VIS. Istovjetne reakcije utvrđene su i ELISA kompletima proizvođača IDEXX (SCHMOLL, 2006.).

Seroprevalencija VIS u životinja obuhvaćenih istraživanjem u RH je 30,3%, te je gotovo identična seroprevalenciji na razini europskih zemalja koje su sudjelovale u programu ESNIP3 (2010. do 2013.) a koja je bila 31%. Zastupljenost podtipa H3N2 u RH je 42,7% a u europskim zemljama je prema podatcima iz 2014. iznosila samo 9,1 % što predstavlja statistički značajnu razliku ($p<0,001$). Podtip H3N2 kružio je u uzgojima svinja u Belgiji, Nizozemskoj, Njemačkoj, Italiji i Španjolskoj ali u istom razdoblju nije bio prisutan u Danskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu i Francuskoj(SIMON i sur., 2014.).Podatci iz 2008. ukazuju da je stopa seroprevalencije podtipa H1N2 bila veća od 50% u Belgiji i Španjolskoj (57.8% i 52.8%), 32.1% u Njemačkoj te puno niža u Italiji, samo 13.8% (VAN REETH i sur., 2008.). U Hrvatskoj je podtip H1N2 zastupljen u 26,3% (odnosi se na $H1_{hu}$). Seroprevalencija na razini Europe razlikuje se po regijama, te čak i po pojedinim uzgojima unutar europskih zemalja.

Uzrok nižoj seroprevalenciji u županijama RH u obalnom i priobalnom dijelu vjerojatno je posljedica općenito manjeg broja životinja u obiteljskim gospodarstvima, povoljnijih klimatskih uvjeta a ne smije se zanemaritini frekvencija i količina pristizanja uzoraka u laboratorij tijekom rutinske dijagnostike. Stoga ne čudi veća seroprevalencija VIS u Brodsko-posavskoj (89,7%) Osječko-baranjskoj (35,72%) i Vukovarsko-srijemskoj (35,68%) županiji u kojima se nalaze najveće farme svinja u RH. Prema podatcima Državnog zavoda za statistiku, u RH je 2011. godine ukupno bilo 1 233 460 svinja (1 072 543 u kontinentalnom dijelu i 160 863 u obalnom dijelu), a 2016. godine 1 163 027 svinja (1 143 951 u kontinentalnom dijelu i 19 076 u obalnom dijelu). Vidljiv je porast ukupnog broja svinja koji je proporcionalan broju novih objekata za intenzivnu proizvodnju, ali i značajan pad broja životinja u manjim gospodarstvima u priobalnom području koji je 2016. godine iznosio samo 11% svinja u odnosu na podatke iz 2011.

U ovom istraživanju smo poseban naglasak stavili na optimizaciju dijagnostičkih pretraga u svrhu rutinske dijagnostike i utvrđivanja statusa svinja u uzgoju. U svrhu određivanja protutijela za VIS u uzorku krvnog seruma svinja, a istovremeno prateći trendove dijagnostike u drugim laboratorijima u svijetu, možemo zaključiti da je uporaba komercijalnih testova za određivanje određenih podtipova VIS u znatnom padu te da se kod aktivnih i pasivnih monitoringa koriste ELISA kompleti za dokazivanje protutijela za nukleoprotein (NP) VIS.

U dosadašnjim studijama promatrao se titar protutijela za podtipove VIS u različitih dobnih skupina. Dobro je poznato da imunološki odgovor u sisajuće ili odbijene prasadi, koja još ima protutijela podrijetlom od majke, može dodatno otežati dijagnostiku. Naime, u takvim slučajevima teško je razlikovati protutijela nastala nakon infekcije određenim podtipom VIS i protutijela u prasadi nastala preboljenjem infekcije ili nastalih cijepljenjem krmača. Kolostrumska protutijela prisutna su u krvnom serumu 2 do 4 mjeseca, ovisno o početnom titru (RENSHAW, 1975.; MADEC i sur., 1985.; EASTERDAY i VAN REETH, 1999.; CANDOTTI i sur., 2003.). U ovom istraživanju utvrdili smo protutijela u prasadi starosti do 4 tjedna u jako niskom titru. Najveći titar (1:64) utvrđen je za podtip H3N2 dok je titar protutijela za podtipove H1N1 svega 1:16, a za podtip H1N2 1:32. U hrvatskim uzgojima svinja nije obavezna vakcinacija pa je za pretpostaviti da su protutijela podrijetlom od majke te da u ovom titru ne mogu pružiti dostatnu zaštitu. Titar protutijela rastao je proporcionalno s dobi prasadi pa je tako najveći titar protutijela u prasadi starosti 5-10 tjedana bio 1:128 (H3N2 i H1N2), a u prasadi dobne kategorije 11-20 tjedana 1:512 (H3N2).Također, važno je napomenuti da odbijena prasad s visokim titrom majčinskih protutijela mogu biti zaštićena od najgoreg ishoda ove bolesti ali ne mogu biti zaštićena od nove infekcije i replikacije virusa (LOEFFEN i sur., 2003.). Titar serumskih protutijela u fazi oporavka može biti niži nego u akutnoj fazi iako je dijagnoza potvrđena izolacijom virusa. Takav nalaz posljedica je inhibicijskog djelovanja majčinskih protutijela na tvorbu aktivneimunosti. Nadalje, majčinska protutijela sprječavaju reakciju s imunokompetentnim stanicama domaćina na način da maskiraju antigenske determinante virusa. Ako je razina majčinskih protutijela niska (većinom u tovljenika), kod pojave infekcije se ujedno javljaju i klinički znakovi bolesti te nepotpun imunološki odgovor (LOEFFEN i sur., 2003.). Prema dosadašnjim saznanjima, količina pasivno stečenih protutijela za VIS drastično pada nakon 3. mjeseca života te je serokonverzija zabilježena u samo 10% pretraženih životinja (MADEC i sur., 1985.).Isti trend prati i hrvatske uzgoje svinja pa je tako utvrđen titar protutijela za sva tri podtipa VIS bio 1:128. Određene razlike u stvaranju protutijela i njihovom poluživotu utvrđene su kod sisajuće prasadi koja su imala majčina protutijela za različite podtipove VIS, pa je tako poluživot protutijela za H1N1 bio 6,6 tjedana, za H1N2 6,3 i za H3N2 čak 7,5 tjedana (CANDOTTI i sur., 2003.) Tijekom ovog istraživanja, značajan porast razine serumskih protutijela zabilježili smo u prvopraskinja u kojih je titar za H3N2 bio čak 1:2048, te krmača u kojih je titar za sva tri podtipa bio 1:512. Jedan od mogućih razloga je pojava novog soja VIS u

uzgojima što možemo djelomično obrazložiti premještanjem rasplodnih svinja nakon odbijanja prasadi (nazimica, krmača i prvopraskinja) u drugi zajednički prostor gdje je čest kontakt s ostalim jedinkama i nerastovima. Za razliku od naših podataka serološkog istraživanja, u Poljskoj je tijekom 2011.-2015. najviša seroprevalencija utvrđena u odbijene prasadi u velikim komercijalnim farmama (CZYŻEWSKA-DORS i sur., 2017.).

Struktura svinjogojske proizvodnje u svijetu razlikuje se ne samo po broju životinja već i po veličini farmi te organizaciji tehnološkog procesa na farmama. Veće proizvodne jedinice uglavnom imaju i učinkovitiju organizaciju proizvodnog procesa na farmi te bolje biosigurnosne uvjete. U dobro organiziranim jedinicama, prije uvođenja nove prasadi, objekti se peru, dezinficiraju, a zidovi ponovno bojaju, postoji zaseban sustav ventilacije i grijanja, prozori su prekriveni mrežom kako ne bi došlo do kontakta ptica sa svinjama, provode se mjere deratizacije i slično, i baš iz tog razloga teško je utvrditi put unosa novog soja virusa kojem svinje do trenutka unosa nisu bile izložene. S obzirom na to da su Danska, Njemačka, Francuska, Poljska, Nizozemska i Španjolska među vodećim izvoznicima svinja i svinjskog mesa u Europi te da se žive svinje uvoze u RH iz nekih od njih, moguće je da se tim životinjama unosi virus u uzgoj.

Infekcija VIS-om u komercijalnim uzgojima javlja se po različitim obrascima, kao akutno izbijanje bolesti u obliku epidemije ili pak endemije. Uvriježeno je mišljenje da ulazak novog soja VIS u stado bude popraćeno izrazitim kliničkim znakovima bolesti u velikog broja životinja (OLSEN i sur., 2006.). Učestalost potvrđenog izbijanja bolesti s kliničkim znakovima bolesti u svinja relativno je niska te je za pretpostaviti da se puno češće infekcija javlja u supkliničkom obliku (MALDONADO i sur., 2006.; SIMON-GRIFÉ i sur., 2011.). Ako isključimo klasičnu epidemiju VIS-om, postoji vrlo malo saznanja o samoj dinamici i održavanju VIS unutar stada u obliku endemije. Sisajuća i odbijena prasad pripadaju najosjetljivijoj dobnoj skupini prijemljivih na infekciju VIS-om jer ih protutijela za homologni soj VIS neće u potpunosti zaštititi od nove infekcije istim ili sličnim sojem (SIMON-GRIFÉ i sur., 2012.). Također, uloga krmača u održavanju kruženja VIS u uzgojima je još uvijek nepoznata i zahtijeva veće istraživanje.

U prijašnjim istraživanjima u Hrvatskoj dokazano je kruženje VIS na temelju dokaza protutijela, no nije se pristupilo dokazivanju ni antigena nitigena VIS. Prvi nalaz antigena u uzorku plućnog tkiva u hrvatskim uzgojima svinja dokazan je imunohistokemijskim postupkom u prasadi primarno oboljeloj od sindroma kržljavosti odbite prasadi (SKOP). Prema

anamnestičkim podatcima, na 4 farme istog proizvođača u Vukovarsko-srijemskoj županiji bili su prisutni znakovi respiratorne infekcije, a na samo jednoj od njih bio je prisutan povećan pomorodbijene prasadi. Poznato je da samostalna infekcija VIS-om ne uzrokuje uginuće, osim ako se radi o životinjama koje su iz nekog razloga imunosuprimirane. U ovom slučaju, naišli smo na primjer istovremene infekcije VIS i svinjskog cirkovirusa tip 2 (PCV2) što je uzrokovalo uginuće velikog broja prasadi u jednoj od 4 farme.Ovo je prikaz samo jednog od predisponirajućih čimbenika kompleksa dišnih bolesti svinja (engl. PRDC, Porcine respiratory disease complex) koji je za posljedicu imao povećano uginuće životinja.

Dosadašnje filogenetske analize ukazuju na prijenos VI između vrsta te preslagivanje segmenata virusa što u konačnici znači stvaranje novih genotipova zabilježenih u nekoliko važnih događanja: prijenos H1N1 podrijetlom od ptica na svinje 1970-tih tijekom kojeg je nastala H1N1 euroazijska svinjska linija koja dominira u Europi i Aziji; preslagivanje gena podtipova H1N1 nalik ptičjim virusima i virusa podrijetlom od ljudi te posljedično nastanak presloženih H1N2 i H3N2 virusa koji kruže u svinja u Europi; složeno preslagivanje H1N1, H1N2 i H3N2 presloženica ptičjih, ljudskih i svinjskih virusa pri čemu su nastali trostruko presloženi virusi uglavnom prisutni u Sjevernoj Americi od 1990-tih do danas, te, na kraju, preslagivanje trostruko presloženih i euroazijskih H1N1 svinjskih VI i stvaranje ljudskog pandemijskog H1N1v iz 2009. godine (PENSAERT i sur., 1981.; CASTRUCCI i sur., 1993.; BROWN i sur., 1998; ZHOU i sur., 1999.; WEBBY i sur.,2000.; OLSEN,2002.; GARTEN i sur., 2009.). Pandemija iz 2009. godine uvelike je rasvijetlila navedenu mogućnost preslagivanja gena VI i pojave novih VI s pandemijskim potencijalom. Naime, u travnju 2009. godine u ljudi u Meksiku i SAD izoliran je do tada neopisan virus influence koji je sadržavao kombinaciju gena koja još nije bila zabilježena ni u Americi ni drugdje u svijetu. Geni NA i M pripadali su euroazijskoj svinjskoj skupini virusa, geni NA, NP i NS pripadali su skupini klasičnih svinjskih virusa, a geni PB2 i PA skupini trostruko presloženih svinjskih virusa koji su podrijetlom od ptica ali su novijeg datuma te su uvedeni u svinjsku populaciju u Sjevernoj Americi oko 1998. godine (GARTEN i sur., 2009). I prije toga se postavljalo pitanje uloge svinje kao domaćina u čijem organizmu se događa preslagivanje gena VI različitih ptica i/ili ljudi, no zadnja pandemija je upravo dokazala raznolikost virusa influence. Istovremenim kruženjem novonastalog pandemijskog H1N1 podtipa s europskim podtipovima H1N1, H1N2 i H3N2 VIS, došlo je do stvaranja različitih presloženih inačica ovih podtipova.

Vodeći se filogenetskim analizama VIS u Europi i manjkom, odnosno, nedostatkom podataka o dokazu VIS molekularnim metodama u zemljama koje okružuju RH (Slovenija, Bosna i Hercegovina, Srbija) pokušali smo pronaći optimalnu molekularnu metodu kojom bi se iz kliničkih uzoraka mogli dokazati geni HA i NA, neophodni za klasifikaciju VIS u RH.

Tijekom ove studije pretražena su ukupno 142 uzorka pluća i 29 nazofaringealnih obrisaka svinja različitih dobnih skupina na prisutnost gena M VIA. Dokazivanje gena M VIA metodom Real time RT-PCR po uputama CDC-a pokazalo se kao najbolja probirna metoda kojom je moguće utvrditi prisutnost virusa u uzorcima plućnog tkiva i nazofaringealnim obriscima.

Gen M dokazan je u 9 uzoraka plućnog tkiva i 7 nazofaringealnih obrisaka. Iako su pretraživane sve dobne skupine, gen M dokazan je samo u prasadi u dobi 4 do 14 tjedana. S obzirom na nisku seroprevalenciju u toj dobnoj skupini i relativno nizak titar protutijela možemo zaključiti da prasad nije imala dovoljnu zaštitu od infekcije VIS-om. S druge strane, u starijih dobnih skupina utvrđen je znatno viši titar protutijela a kako u sezoni pojave influence svinja nismo utvrdili prisutnost dijelova virusnog genoma, očito je da u tih dobnih skupina životinja nije došlo do replikacije virusa iako su vjerojatno bile izložene infekciji VIS.

Umnažanje VIS u kokošjim embrijima i MDCK kulturama stanica bilo je uspješno kada smo imali svježi klinički materijal, no kako su neki uzorci pretraživani naknadno, virus iz njih nije bilo moguće umnožiti jer je izgubio sposobnost umnažanja. Nedostatna količina RNA bila je prepreka u daljnjim pretragama. Jedino rješenje bilo bi kloniranje RNA, što može biti tema u jednom od sljedećih istraživanja.

Kako bi odredili podtip VIS, uzorci koji su bili pozitivni na prisutnost gena M podvrgnuti su amplifikaciji odsječaka gena HA i NA metodom RT-PCR. Radi izrazite genske raznolikosti izolata VIS u Europi i svijetu i nedostatka filogenijskih analiza VIS u RH, isprobali smo nekoliko dostupnih protokola za određivanje gena HA i NA odnosno njihovih odsječaka. Početnicama iz radova prema CHIAPPONI i sur. (2012.) i PHIPPS i sur. (2004.) u hrvatskim izolatima su umnožena dva različita specifična odsječka gena HA (HA1 i HA2). Pokušaj da se umnoži cijeli gen HA prema radu HOFFMANN i sur. (2001.) nije bio uspješan. Prema protokolima iz radova FEREIDOUNI i sur. (2009.) i CHIAPPONI i sur. (2012.) umnoženi su odsječci gena NA a prema protokolu HOFFMANN i sur. (2001.) i cijeli gen NA. Višestruko sravnjivanje sekvencija odsječaka gena HA i NA izolata VIS dobivenih pretraživanjem uzoraka

plućnog tkiva i nazofaringealnih obrisaka koristili smo u filogenetskoj analizi i za izračunavanje postotaka podudarnosti nukleotidnih i aminokiselinskih slijedova. Filogenetska analiza i usporedba s referentnim izolatima VIS koji kruže u europskim zemljama ukazuje na pripadnost hrvatskih izolata euroazijskoj H1N1 svinjskoj skupini virusa nalik ptičjim virusima.

Do 2013. je tijekom ESNIP3 programa u 14 europskih zemalja dokazano da postoje 23 različita genotipa VIS (oznake A do W) od kojih 12 (A do L) ima unutarnje gene podrijetlom od euroazijskog svinjskog podtipa H1N1 nalik ptičjem ($H1_{av}N1$), 8 genotipova (P do W) ima unutarnje gene iz linije pandemijskog VIS H1N1pdm iz 2009. a samo 3 genotipa imaju obje kombinacije unutarnjih gena. Uz prije navedene filogenetske skupine VIS u europskim uzgojima kruže podtipovi $H1_{hu}N2$ te gotovo sporadično i H3N2. Prevalencija genotipova unutar euroazijske skupine SIV nalik ptičjim (kojoj pripadaju i hrvatski izolati), razlikuje se po regijama. Velika je razlika u pojavnosti svih genotipova ovog podtipa VIS ako usporedimo kopneni dio Europe gdje je prevalencija 83% ±11% i Veliku Britaniju sa samo 15%. Prevalencija genotipa A $H1_{av}N1$ najviša je u Belgiji (58%), a najniža u Njemačkoj (18%). U čak 36% uzoraka u Španolskoj zabilježena je prevalencija podtipa H3N2 (Gent/84-like H3N2) genotip B (unutarnji geni podrijetlom od euroazijskog VI nalik ptičjem, HA i NA nalik ljudskom sezonskom VI), dok je u Mađarskoj dostigla 33%. U Francuskoj je tijekom tog razdoblja zabilježen samo jedan uzorak s istim genotipom i to na granici s Belgijom. Ovaj genotip nije izoliran u Danskoj, Poljskoj i Velikoj Britaniji (WATSON i sur., 2015.).U danskim uzgojima svinja dominira presloženi $rH1_{av}N2$ (47%) a isti genotip (D) utvrđen je i u Švedskoj ali u samo dva izolata, te u pojedinačnim slučajevima u Nizozemskoj, Njemačkoj i Italiji. U Velikoj Britaniji u uzgojima svinja prevladavaju genotipovi pandemijskog H1N1, a euroazijska skupina SIV nalik ptičjim zastupljena je u samo 15% (WATSON i sur., 2015.).

Obradom hrvatskih sekvencija specifičnih odsječka gena HA (HA1 i HA2) koji kodira površinski glikoprotein hemaglutinin, te odsječaka gena NA koji kodira neuraminidazu, izolate VIS svrstali smo u euroazijsku skupinu SIV nalik ptičjim ($H1_{av}N1$), no kako se nije pristupilo dokazivanju gena koji kodiraju unutarnje proteine (PB2, PB1, PA, NS1 i NS2), nije bilo moguće utvrditi kojem genotipu pripadaju izolati iz ovog istraživanja.

Daleko opsežnije istraživanje u obliku pasivnog ili aktivnog monitoringa trebalo bi biti provedeno da bi ustanovili koji sve sojevi virusa influence svinja kruže u RH. Za sada smo postavili samo temelje novijeg pristupa dijagnostici VIS u RH.

7. ZAKLJUČCI

- U ovom radu prikazano je prvo veće sustavno istraživanje pojavnosti virusa influence svinja (VIS) u Republici Hrvatskoj te je prvi puta u RH dokazana prisutnost VIS u svinja molekularnim metodama, imunohistokemijskim postupkom te izdvajanjem na kokošjim embrijima i MDCK staničnoj kulturi.

- U hrvatskim uzgojima svinja dokazana su protutijela za podtipove $H1_{av}N1$, $H1_{hu}N2$ i H3N2 virusa influence svinja što znači da sva tri podtipa kruže u uzgojima iako je samo prisutnost podtipa H1N1 dokazana molekularnim metodama.

- Inhibicija hemaglutinacije je specifična i osjetljiva te je jedina serološka metoda kojom bi se trebala dokazivati protutijela za podtipove VIS.

- S obzirom da se u RH ne provodi vakcinacija svinja protiv infekcije VIS-om te da zaključno prasad potječe od nevakciniranih majki i ima nizak titar protutijela, dokazano je da ih majčinska protutijela ne štite u dovoljnoj mjeri od infekcije na što dodatno ukazuje i dokaz VIS samo u prasadi u dobi 4 do 12 tjedana.

- Od primijenjenih metoda za dokaz VIS u kliničkim uzorcima, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu za dokaz gena M pokazala se kao metoda od izbora.

- Filogenetskom analizom umnoženih odsječaka gena HA i NA izolata VIS iz plućnog tkiva i nazofaringealnih obrisaka dokazana je velika genska sličnost euroazijskim svinjskim linijama nalik ptičjim VI koje su, prema dostupnim podatcima, prisutne najvećim dijelom u Danskoj, Nizozemskoj, Njemačkoj, Francuskoj i Mađarskoj.

.

8. POPIS LITERATURE

ABUSUGRA, I. A., T. LINNE, B. KLINGEBORN (1987): The provenance of the Swedish swine influenza H1N1 virus of 1983. Zentralbl. Veterinarmed. B 34, 566-572.

AMBRIOVIĆ RISTOV, A. (ur.) (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

ANONIMNO (2010): Swine influenza. OIE Terrestrial Manual, 2010.

BAIGENT, S. J., J. W. McCAULEY (2001): Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. Virus. Res. 79, 177-185.

BARBE, F., G. LABARQUE, M. PENSAERT, K. VAN REETH (2009): Performance of a commercial Swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses. Journal of veterinary diagnostic investigation: Official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 21, 88-96.

BARBE, F., K. ATANASOVA, K. VAN REETH (2011): Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. Vet. J. 187, 48-53.

BEVERIDGE, W. I. (1977): The start of pandemics: site, season and spread. Dev. Biol. Stand. 39, 443-444.

BLAKEMORE, F., GLEDHILL, A.W. (1941a). Discussion on swine influenza in the British Isles. Proc. R. Soc. Med. 34, 611-615.

BLAKEMORE, F., GLEDHILL, A.W.(1941b). Some observations on an outbreak of swine influenza in England. Vet. Record 53, 227-230.

BROWN, I. H. (2000): The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Vet. Microbiol. 74, 29-46.

BROWN, I. H. (2013): History and epidemiology of Swine influenza in Europe. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 370, 133-146.

BROWN, I. H., P. CHAKRAVERTY, P. A. HARRIS, D. J. ALEXANDER (1995a): Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. Vet. Rec. 136, 328-329.

BROWN, I. H., P. A. HARRIS, D. J. ALEXANDER (1995b): Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2. Epidemiol. Infect. 114, 511-520.

BROWN, I. H., P. A. HARRIS, J. W. McCAULEY, D. J. ALEXANDER (1998): Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. J. Gen. Virol. 79 (Pt 12), 2947-2955.

BROWN, I. H., R. J. MANVELL, D. J. ALEXANDER, P. CHAKRAVERTY, V. S. HINSHAW, R. G. WEBSTER (1993): Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. Vet. Rec. 132, 461-462.

CAMPITELLI, L., I. DONATELLI, E. FONI, M. R. CASTRUCCI, C. FABIANI, Y. KAWAOKA, S. KRAUSS, R. G. WEBSTER (1997): Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. Virology 232, 310-318.

CANDOTTI P., E. FONI, G. LEOTTI, F. JOISEL, S. LONGO, S. ROTA NODARI (2003): Serological prevalence for swine influenza virus in pigs between 3 and 15 weeks of age in Italian farms: evaluation of a maternal antibody decay curve. Proc. 4th International Symposium on Emerging and reemerging pig disease, Rome, Italy, pp. 272-273.

CAPUA, I., O. MUNOZ (2013): Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: open issues which need to be addressed. A review. Vet Microbiol 165, 7-12.

CASTRUCCI, M. R., I. DONATELLI, L. SIDOLI, G. BARIGAZZI, Y. KAWAOKA, R. G. WEBSTER (1993): Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. Virology 193**,** 503-506.

CDC,Centres for Disease Control and Prevention (2009): Realtime RTPCR (rRTPCR) detection and characterization of swine influenza A (version 2009) pp. 8.

CDC,Centres for Disease Control and Prevention (2014): How the Flu Virus Can Change: "Drift" and "Shift". Centres for Disease Control and Prevention.

CHARLEY, B. (1977): Local immunity in the pig respiratory tract. I. Cellular and humoral immune responses following swine influenza infection. Ann. Microbiol. (Paris) 128B, 95-107.

CHIAPPONI, C., A. MORENO, I. BARBIERI, M. MERENDA, E. FONI (2012): Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. J. Virol. Methods 184, 117-120.

CHOI, Y. K., S. M. GOYAL, M. W. FARNHAM, H. S. JOO (2002): Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. VirusRes. 87, 173-179.

CHUN, J. (1919): Influenza including its infection among pigs. Natl. Med. J. (of China) 5, 34-44.

CUNHA, R. G., V. R. VINHA, W. D. PASSOS (1978): Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. Rev. Bras. Biol. 38, 13-17.

CVETNIĆ, S. (2005): Virusne bolesti životinja. Školska knjiga, Zagreb.

CZYŻEWSKA-DORS, E., A. DORS, K. KWIT, Z. PEJSAK, M. POMORSKA-MÓL (2017): Serological survey of the influenza A virus in Polish farrow-to-finish pig herds in 2011–2015 J. Vet. Res. 61, 157-161.

DAS, K.P., MALLICK, B.B., DAS, K. (1981): Note on the prevalence of influenza antibodies in swine. Indian. J. Anim. Sci. 51, 907-8.

DRAŽENOVIĆ, V., A. BARIŠIN (2011): Virusi influence - osobitosti cirkulirajućih sojeva u sezoni 2010/11. MEDICUS 20, 5-11.

DUNHAM, E. J., V. G. DUGAN, E. K. KASER, S. E. PERKINS, I. H. BROWN, E. C. HOLMES, J. K. TAUBENBERGER (2009): Different evolutionary trajectories of European avian-like and classical swine H1N1 influenza A viruses. J. Virol. 83, 5485-5494.

EASTERDAY, B. C. (1980): Animals in the influenza world. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 288, 433-437.

EASTERDAY, B. C., K. VAN REETH (1999): Diseases of Swine, 8th edition. Swine Influenza. Blackwell Science Ltd, Oxford.

ECDC (2014): Swine influenza in pigs. Swine influenza in pigs. European Centre for Disease Prevention and Control.

FEREIDOUNI, S. R., E. STARICK, C. GRUND, A. GLOBIG, T. C. METTENLEITER, M. BEER, T. HARDER (2009): Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. Vet. Microbiol. 135, 253-260.

GARTEN, R. J., C. T. DAVIS, C. A. RUSSELL, B. SHU, S. LINDSTROM, A. BALISH, W. M. SESSIONS, X. XU, E. SKEPNER, V. DEYDE, M. OKOMO-ADHIAMBO, L. GUBAREVA, J. BARNES, C. B. SMITH, S. L. EMERY, M. J. HILLMAN, P. RIVAILLER, J. SMAGALA, M.

DE GRAAF, D. F. BURKE, R. A. FOUCHIER, C. PAPPAS, C. M. ALPUCHE-ARANDA, H. LOPEZ-GATELL, H. OLIVERA, I. LOPEZ, C. A. MYERS, D. FAIX, P. J. BLAIR, C. YU, K. M. KEENE, P. D. DOTSON, JR., D. BOXRUD, A. R. SAMBOL, S. H. ABID, K. ST GEORGE, T. BANNERMAN, A. L. MOORE, D. J. STRINGER, P. BLEVINS, G. J. DEMMLER-HARRISON, M. GINSBERG, P. KRINER, S. WATERMAN, S. SMOLE, H. F. GUEVARA, E. A. BELONGIA, P. A. CLARK, S. T. BEATRICE, R. DONIS, J. KATZ, L. FINELLI, C. B. BRIDGES, M. SHAW, D. B. JERNIGAN, T. M. UYEKI, D. J. SMITH, A. I. KLIMOV, N. J. COX (2009): Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 325, 197-201.

GIBBS, A. J., J. S. ARMSTRONG, J. C. DOWNIE (2009): From where did the 2009 'swine-origin' influenza A virus (H1N1) emerge? Virol. J. 6, 207.

GORMAN, O. T., W. J. BEAN, R. G. WEBSTER (1992): Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 176, 75-97.

GOURREAU, J. M., C. KAISER, M. FONTAINE, F. MADEC, M. AYMARD, A. VIGOUROUX, F. SALINGARDES, J. LABIE (1983): Evolution de la grippe porcine en France. La grippe, grippe humaine, grippe animals, les vaccins. Collection Fondation Marcel Merieux, 65-67.

GOURREAU, J. M., C. KAISER, C. HANNOUN, J. VAISSAIRE, G. GAYOT (1980): Premier isolement en France du virus de l'influenza du porc (Hsw1N1) dans un environement pathologique plurimicrobien. Bull. Acad. Vet. 53, 181-183.

GOURREAU, J. M., C. KAISER, M. VALETTE, A. R. DOUGLAS, J. LABIE, M. AYMARD (1994): Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France. Arch. Virol. 135, 365-382.

GUAN, Y., K. F. SHORTRIDGE, S. KRAUSS, P. H. LI, Y. KAWAOKA, R. G. WEBSTER (1996): Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. J. Virol. 70, 8041-8046.

HAESEBROUCK, F., P. BIRONT, M. B. PENSAERT, J. LEUNEN (1985): Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. Am. J. Vet. Res. 46, 1926-1928.

HAESEBROUCK, F., M. B. PENSAERT (1986): Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine. Vet. Microbiol. 11, 239-249.

HARKNESS, W., G. C. SCHILD, P. H. LAMONT, C. M. BRAND (1972): Studies on relationships between human and porcine influenza. 1. Serological evidence of infection in swine in Great Britain with an influenza A virus antigenically like human Hong Kong-68 virus. Bull. World. Health. Organ. 46, 709-719.

HARNACH, R., R. HUBIK, O. CHVATAL (1950): Isolation of the virus of swine influenza in Czechoslovakia. Cas. Ceskoslov. Vet. 5, 289.

HEINEN, P.P. (2002): Swine influenza: A zoonosis.Vet. Sci. Tomorrow, 1-11.

HINSHAW, V. S., W. J. BEAN, JR., R. G. WEBSTER, B. C. EASTERDAY (1978): The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. Virology 84, 51-62.

HOFFMANN, E., J. STECH, Y. GUAN, R. G. WEBSTER, D. R. PEREZ (2001): Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch. Virol. 146, 2275-2289.

HOWARD, W. A., S. C. ESSEN, B. W. STRUGNELL, C. RUSSELL, L. BARASS, S. M. REID, I. H. BROWN (2011): Reassortant Pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. Emerg. Infect. Dis. 17, 1049-1052.

JUNG, T., C. CHOI, H. K. CHUNG, J. KIM, W. S. CHO, K. JUNG, C. CHAE (2002): Herd-level seroprevalence of swine-influenza virus in Korea. Prev. Vet. Med. 53, 311-314.

KANEGAE, Y., S. SUGITA, K. F. SHORTRIDGE, Y. YOSHIOKA, K. NEROME (1994): Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. Arch. Virol. 134, 17-28.

KAPLAN, B. S., J. DEBEAUCHAMP, E. STIGGER-ROSSER, J. FRANKS, J. C. CRUMPTON, J. TURNER, D. DARNELL, T. JEEVAN, G. KAYALI, A. HARDING, R. J. WEBBY, J. F. LOWE (2015): Influenza virus surveillance in coordinated swine production systems, United States. Emerg. Infect. Dis. 21, 1834-1836.

KAPLAN, M. M., A. M. M. PAYNE (1959): Serological survey in animals for type A influenza in relation to the 1957 pandemic. Bull. WHO 20, 465-488.

KARASIN, A. I., I. H. BROWN, S. CARMAN, C. W. OLSEN (2000a): Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. J Virol. 74, 9322-9327.

KARASIN, A. I., J. LANDGRAF, S. SWENSON, G. ERICKSON, S. GOYAL, M. WOODRUFF, G. SCHERBA, G. ANDERSON, C. W. OLSEN (2002): Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. J. Clin. Microbiol. 40, 1073-1079.

KARASIN, A. I., C. W. OLSEN, G. A. ANDERSON (2000b): Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. J. Clin. Microbiol. 38, 2453-2456.

KARASIN, A. I., M. M. SCHUTTEN, L. A. COOPER, C. B. SMITH, K. SUBBARAO, G. A. ANDERSON, S. CARMAN, C. W. OLSEN (2000c): Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. Virus. Res. 68, 71-85.

KATSUDA, K., S. SATO, T. SHIRAHATA, S. LINDSTROM, R. NEROME, M. ISHIDA, K. NEROME, H. GOTO (1995): Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. J. Gen. Virol. 76 (Pt 5), 1247-1249.

KHATRI, M., V. DWIVEDI, S. KRAKOWKA, C. MANICKAM, A. ALI, L. WANG, Z. QIN, G. J. RENUKARADHYA, C. W. LEE (2010): Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus. J. Virol. 84, 11210-11218.

KOEN, J.S. (1919): A practical method for field diagnoses of swine diseases. Am. J. Vet. Med. 14, 468-470.

KUČAK, A. (2010): Specifičnost i osjetljivost imunokromatografskog testa za brzo otkrivanje influence tipa A (H1N1). Biološki odsjek. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb. pp. 72.

KUNTZ-SIMON, G., F. MADEC (2009): Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. Zoonoses Public Health 56, 310-325.

LAMB, R. A., P. W. CHOPPIN (1983): The gene structure and replication of influenza virus. Annu. Rev. Biochem. 52, 467-506.

LAMB, R. A., R. M. KRUG (2001) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. (Knipe, D.M., M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus, ur.) Fields Virology 4thed. Lippincott Williams i Wilkins, 1487 - 1531.

LAMONT, H. G. (1938): The problems of the practitioner in connection with the differential diagnosis and treatment of diseases of young pigs. Vet. Rec. 50, 1377-1390.

LANGE, E., D. KALTHOFF, U. BLOHM, J. P. TEIFKE, A. BREITHAUPT, C. MARESCH, E. STARICK, S. FEREIDOUNI, B. HOFFMANN, T. C. METTENLEITER, M. BEER, T. W. VAHLENKAMP (2009): Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. J. Gen. Virol. 90, 2119-2123.

LANGE, J., M. GROTH, M. SCHLEGEL, A. KRUMBHOLZ, K. WIECZOREK, R. ULRICH, S. KOPPEN, K. SCHULZ, D., H. J. SELBITZ, A. SAUERBREI, M. PLATZER, R. ZELL, R. DURRWALD (2013): Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. Vet. Microbiol. 167, 345-356.

LANZA, I., I. H. BROWN, D. J. PATON (1992): Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. Res. Vet. Sci. 53, 309-314.

LEE, B. W., R. F. BEY, M. J. BAARSCH, M. E. LARSON (1995): Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. Vet. Microbiol. 43, 241-250.

LOEFFEN, W. L., P. P. HEINEN, A. T. BIANCHI, W. A. HUNNEMAN, J. H. VERHEIJDEN (2003): Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. Vet. immunol. immunopathol. 92**,** 23-35.

MADEC, F., J. M. GOURREAU, C. KAISER, J. LE DANTEC, P. VANNIER, M. AYMARD (1985): [The persistence of activity of H1N1 (swine) influenza virus in pig breeding units during non-epidemic phases]. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 8, 247-258.

MALDONADO J., K. VAN REETH, P. RIERA, M. SITJÀ, N. SAUBI, E. ESPUÑA, C. ARTIGAS (2006): Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. Vet. J. 172, 377-381.
(Simon-Grife, 2012 #97)

MADIĆ, J., M. LOJKIĆ (2004): Emergentne i reemergentne virusne zoonoze. In: BALENOVIĆ, T. (ed). Treći veterinarski kongres. Hrvatska veterinarska komora Opatija. pp. 165-186.

MAEDA, Y., T. HORIMOTO, Y. KAWAOKA (2003): Classification and genome structure of influenza virus. Nihon Rinsho. J. Clin. Med. 61, 1886-1891.

MAROZIN, S., V. GREGORY, K. CAMERON, M. BENNETT, M. VALETTE, M. AYMARD, E. FONI, G. BARIGAZZI, Y. LIN, A. HAY (2002): Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. J. Gen. Virol. 83, 735-745.

MARTINSSON, K., B. KLINGEBORN, G. ROCKBORN (1983): Utbrott av influenza suisl Sverige. Sven. Vet. 35- 37.

MASUREL, N., G. F. DE BOER, W. J. ANKER, A. D. HUFFELS (1983): Prevalence of influenza viruses A-H1N1 and A-H3N2 in swine in the Netherlands. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 6, 141-149.

MEF RIJEKA (2015): Osnove imunohistokemijskih metoda. Medicinski fakultet Rijeka, Zavod za patologiju i patološku anatomiju, Rijeka.

METREVELI, G., Q. GAO, I. MENA, M. SCHMOLKE, M. BERG, R. A. ALBRECHT, A. GARCIA-SASTRE (2014): The origin of the PB1 segment of swine influenza A virus subtype H1N2 determines viral pathogenicity in mice. Virus. Res. 188, 97-102.

MITNAUL, L. J., M. N. MATROSOVICH, M. R. CASTRUCCI, A. B. TUZIKOV, N. V. BOVIN, D. KOBASA, Y. KAWAOKA (2000): Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. J. Virol. 74, 6015-6020.

MORENO, A., L. DI TRANI, S. FACCINI, G. VACCARI, D. NIGRELLI, M. B. BONIOTTI, E. FALCONE, A. BONI, C. CHIAPPONI, E. SOZZI, P. CORDIOLI (2011): Novel H1N2 swine

influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. Vet. Microbiol. 149, 472-477.

MORIN, M., J. B. PHANEUF, R. SAUVAGEAU, E. DIFRANCO, G. MARSOLAIS, A. BOUDREAULT (1981): An epizootic of swine influenza in Quebec. Can. Vet. J. 22, 204-205.

MURPHY, B.R., R.G. WEBSTER (1996): Orthomyxoviruses. In: Fields Virology. 3rd ed. (Fields, B.N., D.M. Knipe, P.M. Howley, Eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1353-1445.

NARDELLI, L., S. PASCUCCI, G. L. GUALANDI, P. LODA (1978): Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. J. Vet. Med. B. 25, 853-857.

NAYAK, D. P., M. J. TWIEHAUS, G. W. KELLEY, N. R. UNDERDAHL (1965): Immunocytologic and histopathologic development of experimental swine influenza infection in pigs. Am. J. Vet. Res. 26, 1271-1283.

NEROME, K., M. ISHIDA, A. OYA, K. ODA (1982): The possible origin H1N1 (Hsw1N1) virus in the swine population of Japan and antigenic analysis of the isolates. J. Gen. Virol. 62 (Pt 1), 171-175.

NEUMEIER, E., H. MEIER-EWERT, N. J. COX (1994): Genetic relatedness between influenza A (H1N1) viruses isolated from humans and pigs. J. Gen. Virol. 75 (Pt 8), 2103-2107.

OLSEN, C. W. (2002): The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus res. 85**,** 199-210.

OLSEN, C. W., I. BROWN, B. C. EASTERDAY, K. VAN REETH (2006):Swine influenza. U: Diseases of Swine, 9th ed. Iowa State University Press, Ames. 469-482.

OLSEN, C. W., S. CAREY, L. HINSHAW, A. I. KARASIN (2000): Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. Arch. Virol. 145, 1399-1419.

OSTERHAUS, A. (2000): Circulation of virus and interspecies contamination in wild animals. Bull. Soc. Pathol. Exot. 93, 156.

OTTIS, K., P. A. BOLLWAHN, K. HEINRITZI (1981): Ausbruch von Scheineninfluenza in der Bundesrepublik Deutchland: Klinik, Nachweis und Differenzierung. Tierartzl. Umschau 36, 608-612.

PEIRIS, J. S., Y. GUAN, D. MARKWELL, P. GHOSE, R. G. WEBSTER, K. F. SHORTRIDGE (2001): Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? J. Virol. 75, 9679-9686.

PENSAERT, M., K. OTTIS, J. VANDEPUTTE, M. M. KAPLAN, P. A. BACHMANN (1981): Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. Bull. World Health Organ. 59, 75-78.

PHIPPS, L. P., S. C. ESSEN, I. H. BROWN (2004): Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. J. Virol. Methods 122, 119-122.

POLJAK, Z., C. E. DEWEY, S. W. MARTIN, J. CHRISTENSEN, S. CARMAN, R. M. FRIENDSHIP (2008): Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. Can. J. Vet. Res. 72, 7-17.

PRESTI, R. M., G. ZHAO, W. L. BEATTY, K. A. MIHINDUKULASURIYA, A. P. DA ROSA, V. L. POPOV, R. B. TESH, H. W. VIRGIN, D. WANG (2009): Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family *Orthomyxoviridae*. J. Virol. 83, 11599-11606.

PRIMORAC, D., F. PAIĆ (2005): Metode molekularne biologije u medicini. Statistička obrada rezultata i utvrđivanje vjerodostojnosti identifikacije. Medicinska naklada, Zagreb. 113-116.

REID, A. H., T. G. FANNING, J. V. HULTIN, J. K. TAUBENBERGER (1999): Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1651-1656.

REKIK, M. R., D. J. ARORA, S. DEA (1994): Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Clin. Microbiol. 32, 515-518.

RENSHAW, H. W. (1975): Influence of antibody-mediated immune suppression on clinical, viral, and immune responses to swine influenza infection. Am. J. Vet. Res. 36**,** 5-13.

ROBERTS, D. H., S. F. CARTWRIGHT, G. WIBBERLEY (1987): Outbreaks of classical swine influenza in pigs in England in 1986. Vet. Rec. 121, 53-55.

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, S. TERZIĆ, T. KEROS, J. BALATINEC, T. FLORIJANČIĆ (2012): Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. J. Wildl. Dis. 48, 131-137.

ROIĆ, B., A. JUNGIĆ, L. JEMERŠIĆ, S. TERZIĆ, J. BALATINEC, T. KEROS (2010): Detection of influenza virus antibodies in domestic pigs in Croatia. 32. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin (ÖGHMP), Wien. pp. 27-28.

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, V. SAVIĆ, S. TERZIĆ, T. KEROS, A. JUNGIĆ, J. BALATINEC (2011): Seroprevalence of antibodies against swine influenza virus in farm swines of different age in Croatia. International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Barcelona, Spain.

SCHMOLL, F., C. LANG, R. DÜRRWALD, V. HERWIG, C. LAUE, I. SOMMERFELD-STUR, W. SIPOS (2006): Restrictions of commercial swine influenza ELISA kits for subtype-specific differentiation of swine influenza A-viruses. 19th IPVS Congress,Vol. 2. Copenhagen, Denmark. pp. 135.

SHOPE, R. E. (1931): The Etiology of Swine Influenza. Science 73**,** 214-215.

SHOPE, R. E. (1931a): Swine Influenza : III. Filtration Experiments and Etiology. J. Exp. Med. 54**,** 373-385.

SHOPE, R. E. (1931b): Swine Influenza : I. Experimental Transmission and Pathology. J. Exp. Med. 54**,** 349-359.

SHOPE, R. E. (1964): Diseases of Swine 2nd ed. Swine influenza. Iowa State University Press, Ames. 109-126.

SHORTRIDGE, K. F., R. G. WEBSTER (1979): Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in Southeast Asia. Intervirol. 11, 9-15.

SIMON-GRIFÉ, M., G. E. MARTÍN-VALLS, M. J. VILAR, I. GARCÍA-BOCANEGRA, M. MORA, M. MARTIN, E. MATEU, J. CASAL (2011): Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. Vet. Microbiol. 149, 56-63.

SIMON-GRIFÉ, M., G. E. MARTÍN-VALLS, M. V. VILAR, N. BUSQUETS, M. MORA, T. M. BESTEBROER, R. A. M. FOUCHIER, M. MARTÍN, E. MATEU, J. CASAL (2012): Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment.Vet. Res. 43, 24.

SIMON-GRIFE, M., L. E. LARSEN, R. DUERRWALD, E. FONI, T. HARDER, K. VAN REETH,I. MARKOWSKA-DANIEL, S. M. REID, A. DAN,J. MALDONADO, A. HUOVILAINEN, C. BILLINIS, I. DAVIDSON, M. AGUEERO, T. VILA, S. HERVE, S. Ø.,

BREUM, C. CHIAPPONI, K. K. URBANIAK,I.H. BROWN, W. LOEFFEN and CONSORTIUM (2014): European Surveillance Network for Influenza in Pigs: Surveillance Programs, DiagnosticTools and Swine Influenza Virus Subtypes Identified in 14 European Countries from 2010 to2013 PLoS One 9, 1-21.

SINNECKER, H., R. SINNECKER, E. ZILSKE, A. STREY, D. LEOPOLDT (1983): Influenza virus A/swine-outbreaks in domestic pigs and antibody findings in human sera. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A. 255, 209-213.

SORENSEN, K. J., HAVE, P. D., RONSHOLT, L., HAGE, J.M., WESTERGAARD, PEDERSEN, K. B. (1981): Influenza hos svin in Danmark. Dan. Vet. Tijdsskr. 64, 826-829.

SPACKMAN, E., D. A. SENNE, T. J. MYERS, L. L. BULAGA, L. P. GARBER, M. L. PERDUE, K. LOHMAN, L. T. DAUM, D. L. SUAREZ (2002): Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J. Clin. Microbiol. 40, 3256-3260.

ŠIMUNDIĆ, A. M. (2008): Interval pouzdanosti. Biochemia Medica 2, 154-161.

TONG, S., X. ZHU, Y. LI, M. SHI, J. ZHANG, M. BOURGEOIS, H. YANG, X. CHEN, S. RECUENCO, J. GOMEZ, L. M. CHEN, A. JOHNSON, Y. TAO, C. DREYFUS, W. YU, R. MCBRIDE, P. J. CARNEY, A. T. GILBERT, J. CHANG, Z. GUO, C. T. DAVIS, J. C. PAULSON, J. STEVENS, C. E. RUPPRECHT, E. C. HOLMES, I. A. WILSON, R. O. DONIS (2013): New world bats harbor diverse influenza A viruses. PLoS Pathog. 9, e1003657.

TSE, M., M. KIM, C. H. CHAN, P. L. HO, S. K. MA, Y. GUAN, J. S. PEIRIS (2012): Evaluation of three commercially available influenza A type-specific blocking enzyme-linked immunosorbent assays for seroepidemiological studies of influenza A virus infection in pigs. Clin. Vaccin. Immunol. 19**,** 334-337.

URBANIAK, K., I. MARKOWSKA-DANIEL (2014): *In vivo* reassortment of influenza viruses. Acta. Biochim. Pol. 61, 427-431.

VANDEPUTTE, J., M. PENSAERT, F. CASTRYCK (1980): Serological diagnosis and distribution of swine influenzaviruses in Belgium. Vlaams. Diergeneeskd. Tijdschr. 49, 1-7.

VAN REETH, K., I. H. BROWN, R. DURRWALD, E. FONI, G. LABARQUE, P. LENIHAN, J. MALDONADO, I. MARKOWSKA-DANIEL, M. PENSAERT, Z. POSPISIL, G. KOCH (2008): Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. Influenza. Other. Respir. Viruses 2, 99-105.

VAN REETH, K., M. PENSAERT (1994a): Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. Vet. Rec. 135, 594-597.

VAN REETH, K., M. B. PENSAERT (1994b): Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. Am. J. Vet. Res. 55, 1275-1281.

VAN REETH, K., H. NAUWYNCK, M. PENSAERT (1996): Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. Vet. Microbiol. 48, 325-335.

VAN REETH, K., I. H. BROWN, M. PENSAERT (2000): Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium. Vet. Rec. 146, 588-589.

VAN REETH, K., S. VAN GUCHT, M. PENSAERT (2002): Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs. Viral. Immunol. 15, 583-594.

VAN REETH, K., G. LABARQUE, M. PENSAERT (2006): Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. Viral Immunol. 19, 373-382.

VAN REETH, K., W. MA (2013): Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 370, 173-200.

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

WATSON, S.J., P. LANGAT, S.M. REID, T.T. LAM, M. COTTEN, M. KELLY, K. VAN REETH, Y. QIU, G. SIMON, E. BONIN, E. FONI, C. CHIAPPONI, L. LARSEN, C. HJULSAGER, I. MARKOWSKA-DANIEL, K. URBANIAK, R. DÜRRWALD, M. SCHLEGEL, A. HUOVILAINEN, I. DAVIDSON, Á .DÁN, W. LOEFFEN, S. EDWARDS, M. BUBLOT, T. VILA, J. MALDONADO, L.VALLS, ESNIP3 CONSORTIUM, I.H. BROWN, O.G. PYBUS, P. KELLAM (2015): Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. J. Virol. 89, 9920–9931.

WEBBY, R. J., S. L. SWENSON, S. L. KRAUSS, P. J. GERRISH, S. M. GOYAL, R. G. WEBSTER (2000): Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. J. Virol. 74, 8243-8251.

WEBSTER, R. G., W. J. BEAN, O. T. GORMAN, T. M. CHAMBERS, Y. KAWAOKA (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 56, 152-179.

WHO (2002): Manual on animal influenza diagnosis and surveillance.

WILSON, I. A., N. J. COX (1990): Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Annu. Rev. Immunol. 8, 737-771.

YAMANE, N., J. ARIKAWA, T. ODAGIRI, M. KUMASAKA, N. ISHIDA (1978): Distribution of antibodies against swine and Hong Kong influenza viruses among pigs in 1977. Tohoku. J. Exp. Med. 126, 199-200.

YUANJI, G., U. DESSELBERGER (1984): Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. J. Gen. Virol. 65 (Pt 11), 1857-1872.

ZHOU, N. N., D. A. SENNE, J. S. LANDGRAF, S. L. SWENSON, G. ERICKSON, K. ROSSOW, L. LIU, K. YOON, S. KRAUSS, R. G. WEBSTER (1999): Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. J. Virol. 73, 8851-8856.

ZHOU, N. N., D. A. SENNE, J. S. LANDGRAF, S. L. SWENSON, G. ERICKSON, K. ROSSOW, L. LIU, K. J. YOON, S. KRAUSS, R. G. WEBSTER (2000): Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. Vet. Microbiol. 74, 47-58.

ŽUPANČIĆ, Ž., S. KOVAČ, V. DRAŽENOVIĆ, B. JUKIĆ, Z. MILAS, Z. JANICKI, V. STAREŠINA (2000): A serologic survey of hemagglutination-inhibition antibodies to human type A and B influenza viruses in wild pigs in Croatia. Vet. Med. 45, 347-351.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Andreja Jungić rođena je 6. veljače 1976. godine u Zagrebu gdje je završila Školu za zdravstvene tehničare laboratorijskog smjera. Diplomirala je na studiju veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu 2004. godine. U Hrvatskom veterinarskom institutu zaposlena je 2006. godine u Laboratoriju za patologiju preživača i transmisivne spongiformne encefalopatije, a od 2009. godine radi u Odjelu za virologiju u Laboratoriju za serološku dijagnostiku virusnih bolesti. Poslijediplomski doktorski studij iz veterinarskih znanosti upisala je 2010/2011. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Usavršavala se u institutu za zdravlje životinja, Pirbright Institute u Engleskoj gdje stječe napredna znanja u području serološke i molekularne dijagnostike virusnih bolesti, prije svega bolesti slinavke i šapa i vezikularne bolesti svinja.

Metode molekularne biologije usavršila je na Institutu "Ruđer Bošković" sudjelovanjem na metodološkom tečaju u biologiji i medicini "DNA i RNA".

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

NOVOSEL, D., D. CADAR, T. TUBOLY, **A. JUNGIĆ**, T. STADEJEK, T. AIT-ALI, A. CSÁGOLA (2018): Investigating porcine parvoviruses genogroup 2 infection using in situ polymerase chain reaction. BMC Vet. Res. 14, 163.

ROIĆ, B., S. TERZIĆ, T. FLORIJANČIĆ, J. PRPIĆ, S. OZIMEC, L. JEMERŠIĆ, I. BOŠKOVIĆ, **A. JUNGIĆ**, T. KEROS (2018): Preliminary serological and molecular investigation of selected viral pathogens in Croatian cervid species. Acta vet. (Beograd) 68 (1), 65-79.

NOVOSEL, D., T. TUBOLY, A. CSAGOLA, M. LORINCZ, V. ČUBRIĆ-ČURIK, **A. JUNGIĆ**, I. ČURIK, J. SEGALES, M. CORTEY, Z. LIPEJ (2014): Origin of porcine circovirus type 2 (PCV2) from swine affected by PCV2-associated diseases in Croatia. Vet. Rec. 174 (17), 431-431.

BEDEKOVIĆ, T., N. LEMO, I. LOJKIĆ, Ž. MIHALJEVIĆ, **A. JUNGIĆ**, Ž. CVETNIĆ, Ž. ČAČ, P. HOSTNIK (2013):Modification of the fluorescent antibody virus neutralisation test-Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. J. Virol. Methods 189, 204-208.

BEDEKOVIĆ, T., Ž. MIHALJEVIĆ, **A. JUNGIĆ**, N. LEMO, I. LOJKIĆ,Ž.CVETNIĆ, Ž. ČAČ (2013): Detection of Bovine viral diarrhea virus-specific neutralizing antibodies in fresh colostrum : A modification of the virus neutralization test. J.Vet.Diagn.Invest. 25, 263-266.

NOVOSEL D., Z. LIPEJ, V. ČUBRIĆ-ČURIK, **A. JUNGIĆ** (2012): Presence of Torque teno virus sus virus in porcine circovirus type 2-associated diseases in Croatia. Vet. Rec. 171 (21), 529.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, Z. KROVINA, S. TERZIĆ, **A. JUNGIĆ**, T. KEROS, J PRPIĆ, D. BRNIĆ (2013): Nacionalni program nadziranja bolesti Aujeszkoga u domaćih svinja u R.Hrvatskoj tijekom 2011. godine. Vet. stanica 44 (1), 19-26.

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, S. TERZIĆ, **A. JUNGIĆ**, D. BRNIĆ (2013): Current study of porcine circovirus type 2 in Croatian pig populations. Savremena poljoprivreda 62 (1-2), 91-98.

ROIĆ, B., T. KIŠ, **A. JUNGIĆ**, B. BAČANEK, M. LOLIĆ, A. TOMAC, D. LUKAČEVIĆ (2013): Provedba nacionalnog programa iskorjenjivanja enzootske leukoze goveda (ELG) u Republici Hrvatskoj u 2011. godini. Vet. stanica 44 (2), 87-96.

ROIĆ, B., M. BRSTILO, **A. JUNGIĆ**, I. LOJKIĆ (2010): Rasprostranjenost enzootske leukoze goveda (ELG) u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2009. godine. Vet. stanica 41, 211-219.

Ostali radovi u drugim časopisima

BEDEKOVIĆ, T., I. LOJKIĆ, N. LEMO, L. JEMERŠIĆ, T. KEROS, J. BALATINEC, D. BRNIĆ, B. ROIĆ, **A. JUNGIĆ**, I. LOHMAN, T. KIŠ, I. SUČEC, Ž. CVETNIĆ (2013): Infekcija Schmallenberg virusom - opis slučaja u Republici Hrvatskoj. Vet. stanica. 44 (2) 135-139.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

NOVOSEL, D., Z. LIPEJ, A. VOJTA, P. FORGACH, **A. JUNGIĆ**, K. BRANOVIĆ-ČAKANIĆ (2010): Immunohistochemical detection of hepatitis E virus in naturally affected pigs. Proceedings oft he 28th Meeting of the European Society of Veterinary pathology and European College of Veterinary Pathologists, 8.-11.9.2010., Beograd, 355-355.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

ROIĆ B., L. JEMERŠIĆ, S. TERZIĆ, **A. JUNGIĆ**, D. BRNIĆ, T. KEROS, J. PRPIĆ (2013): Serological surveillance for some viral agents in roe deer (Capreolus capreolus) and red deer (Cervus elaphus) in Croatia. Abstracts of the 5th European Congress of Virology, 10.-14.2013., Montrouge, France. Virologie 17. 212-212.

JEMERŠIĆ, L., J. PRPIĆ, N. PANDAK, D. BRNIĆ, O. ĐAKOVIĆ RODE, T. KEROS, B. ROIĆ, **A. JUNGIĆ**, T. BEDEKOVIĆ, I. LOJKIĆ (2013): Hepatitis E virus (HEV): genetic relationship of the first identified human strain and swine strains in Croatia Abstracts of the 5th European Congress of Virology,10.-14.2013., Montrouge, France. Virologie 17. 191-191.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

NOVOSEL, D., V. ČUBRIĆ-ČURIK, Z. LIPEJ, **A. JUNGIĆ** (2011): The first report of presence of Torque teno virus (TTV) in pigs in Croatia. Abstracts of International Symposioum on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 12.-15.6.2011., Barcelona.pp. 314-314.

NOVOSEL, D., T. TUBOLY, Z. LIPEJ, A. CSAGOLA, M. LORINCZ, **A. JUNGIĆ** (2011): Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates in Croatia – Update Abstracts of International Symposioum on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 12.-15.6.2011., Barcelona.pp. 88-88.

LIPEJ, Z., D.NOVOSEL, A.VOJTA, P. FORGACH, **A. JUNGIC**, K. BRANOVIĆ-ČAKANIĆ (2010): Histopathological findings in domestic pigs with natural HEV infection. Book of abstracts of the 28th Meeting of the European Society of Veterinary pathology and European College of Veterinary Pathologists, Beograd 8.-11.9.2010.pp. 99-99.

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom

BRNIĆ, D., B. ROIĆ, **A. JUNGIĆ**, T. BEDEKOVIĆ (2016): Epidemijski proljev svinja: nova prijetnja hrvatskom svinjogojstvu?. Zbornik 6. Hrvatskog veterinarskog kongresa, 26.-29.10.2016., Opatija. 243-248.

Sažeci u zbornicima skupova

VILIBIĆ-ČAVLEK, T., T. ŽUPANC, A. BABIĆ-ERCEG, M. BALENOVIĆ, LJ. BARBIĆ, LJ. BETICA RADIĆ, M. BOGDANIĆ, K. CAPAK, P. JELIČIĆ, L. JEMERŠIĆ, **A. JUNGIĆ**, B. KAIĆ, A. KLOBUCAR, B. KOLARIĆ, M. LIČINA, S. KARABUVA, S. KRČMAR, E. LISTEŠ, B. LUKŠIĆ, J MADIĆ, B. MIKLAUŠIĆ, D. OVČAR, N. PANDAK, LJ. PERIĆ, T. POTOČNIK-HUNJADI, J. PRPIĆ, D. SABADI, V. SAVIĆ, V. STEVANOVIĆ, I. TABAIN, IRENA, I. TOPLAK, S. ZEMBER, G. SAVINI (2018). Prevalence and molecular epidemiology of emerging and re-emerging arboviral infections in Croatia, 2017. Vrnjačka Banja, Srbija, 18-20.04.2018.Book of Abstracts. XX Symposium of Epizootiologists and Epidemiologists, 37-37.

SAVIĆ, V., LJ. BARBIĆ, **A. JUNGIĆ**, V. STEVANOVIĆ, A. KUČAK, T. VILIBIĆ-ČAVLEK (2016): Virusi influence A u ptica i sisavaca: epidemiološki i zoonotski aspekti.11. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 8.hrvatski kongres o infektivnim bolestima, Poreč, Hrvatska, 20-23.10.2016.

SAVIĆ, V., LJ. BARBIĆ, **A. JUNGIĆ**, V. DRAŽENOVIĆ (2016): Zoonotski potencijal animalnih i humanih virusa influence. "Jedno zdravlje" – emergentne i re-emergentne zoonoze: prošlost, sadašnjost i budućnost, Zagreb, Hrvatska, 16.06.2016.

JUNGIĆ A., I. LOJKIĆ, B. ROIĆ, T. BEDEKOVIĆ, N. KREŠIĆ, L. JEMERŠIĆ, T. KEROS, D. BRNIĆ, J. PRPIĆ (2013): Schmallenberg virus infection in cattle in Croatia. 31st World Veterinary Congress, Proceedings&Abstracts, World Veterinary Association, Prag. ID 234.

BRNIĆ, D., L. JEMERŠIĆ, T. KEROS, J. PRPIĆ, T. BEDEKOVIĆ, I. LOJKIĆ, N. KREŠIĆ, B. ROIĆ, **A. JUNGIĆ**, V. STAREŠINA (2013): High prevalence and genetic variability of porcine astroviruses in pigs on backyard holdings in Croatia. 31st World Veterinary Congress, Proceedings&Abstracts, World Veterinary Association, Prag. ID 136.

NOVOSEL, D., V. CUBRIC-CURIK, D. CADAR, **A. JUNGIC**, Z. LIPEJ (2012): Investigation of TTSuV in nephropathy cases in pigs affected by PMWS. The International Pig Veterinary Society (IPVS) Proceedings, Korea, pp. 1064-1064.

NOVOSEL, D., C.K. HJULSAGER, L.E. LARSEN, M. BOYE, T.K. JENSEN, **A. JUNGIC**, Z. LIPEJ (2012): In situ hybridization to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus. EuroPRRS Symposium Proceedings, Hungary. pp. 54-55.

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, T. KEROS, S. TERZIĆ, **A. JUNGIĆ**, J. PRPIĆ (2012): A serological survey of pseudorabies in domestic swine population in Croatia in 2011. Book of abstracts oft he 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Primošten, 2012. 98.

JUNGIĆ A., B. ROIĆ (2011): Presence of antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Sindrome Virus in farm swines in eastern part of Croatia from 2009 to 2010. EuroPRRS 2011 Symposium "Understanding and combating PRRS in Europe" Proceedings, Novi Sad, 2011. 41-41.

JUNGIĆ, A.,D. NOVOSEL, Z. LIPEJ, B. ROIĆ (2010): Detection of porcine reproductive and respiratory syndromein Croatian pig farms based on serology and IHC. 32. Jahrestagung der Osterreichischen Gesellschaft fur Hygiene, Mikrobiologie und Praventivmedizin (OGHMP)2010 (The Austrian Society for Hygiene, Microbiology and Preventive Medicine, 2010) Abstracts, Beč. 118-119.

JUNGIĆ, A., B. ROIĆ, I. LOJKIĆ, M. LOJKIĆ (2009): Primjena imunoenzimnog testa i PCR u dijagnozi enzootske leukoze goveda. Zbornik sažetaka Znanstveno stručnog sastanka "Veterinarska znanost i struka", Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, 2009. 90-91.

Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

NOVOSEL, D., T. STADEJEK, K. CHRABOS, Z. LIPEJ, B. ROIĆ**, A. JUNGIĆ** (2010): Histopathological findings in fetuses positive on porcine reproductive and respiratory syndrome by PCR or immunohistochemistry. Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Science, Vancouver, Kanada, 18-21.07.2010. 202-202.