



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

**УПОРЕДНО ИСПИТИВАЊЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ  
ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ  
ИМУНОЕНЗИМСКИМ И ВИРУС  
НЕУТРАЛИЗАЦИОНИМ ТЕСТОМ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

Проф. др Драган Роган

Кандидат:

Милена Самојловић ДВМ

Нови Сад, 2019. године



UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE  
DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE

**COMPARATIVE EXAMINATION OF ANTIBODIES  
AGAINST LUMPY SKIN DISEASE VIRUS BY  
ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY AND VIRUS  
NEUTRALIZATION TEST**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor:

Prof. Dragan Rogan, PhD

Candidate:

Milena Samojlović DVM

Novi Sad, 2019

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Milena Samojlović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Dragan Rogan, redovni profesor
Naslov rada: NR	Uporedno ispitivanje antitela protiv virusa bolesti kvrgave kože imunoenzimskim i virus neutralizacionim testom
Jezik publikacije: JP	Srpski (ćirilica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	9 poglavlja / 120 stranica / 10 slika / 20 tabela / 11 grafikona/ 1 šema/ 1 formula / 149 referenci / 5 priloga
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Veterinarska virusologija i imunologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Bolest kvrgave kože, goveda, antitela, ELISA, VNT, imunitet, pasivni imunitet
UDK	636.09:636.2.084(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Bolest kvrgave kože (lumpy skin disease – LSD) je virusno oboljenje goveda, veoma važno sa ekonomskog aspekta, zbog velikih gubitaka u govedarskoj proizvodnji. Brzi i pouzdani laboratorijski testovi su neophodni, kako za rano otkrivanje bolesti i utvrđivanje statusa zapata, tako i za praćenje imunološkog statusa jedinki nakon vakcinacije, koja je i dalje najsigurnija mera u borbi protiv ove bolesti. Radi sprovođenja efikasnih mera kontrole protiv LSD, kao što su pravovremena vakcinacija, naročito teladi i serološki nadzor zapata, neophodno je vršiti istraživanja vezana za postvakcinalni imunološki odgovor, kako kod odraslih jedinki, tako i kod teladi. Cilj ove doktorske disertacije je praćenje antitela protiv virusa bolesti kvrgave kože (lumpy skin disease virus – LSDV) kod vakcinisanih krava, praćenje perzistencije maternalnih antitela kod teladi poreklom od vakcinisanih krava, kao i sprovođenje postupka validacije i potvrde primene modifikovanog virus neutralizacionog testa razvijenog na Odeljenju za virusologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“.</p> <p>Materijal za ispitivanje korišćen u ovom istraživanju potiče od goveda sa područja u kojima nije registrovana bolest tokom epizootije u Srbiji 2016. godine (Južnobački, Sremski i Južnobanatski okrug), a vakcinacija goveda protiv bolesti kvrgave kože je počela da se sprovodi tokom jula meseca 2016. godine. Upporedno ispitivanje je izvršeno na ukupno 355 uzoraka krvnih seruma krava, 15 uzoraka kolostruma i 270 uzoraka krvnih seruma teladi. Za uporedno ispitivanje prisustva antitela protiv LSDV u uzorcima korišćene su metode ELISA i virus neutralizacioni test (VNT). ELISA test je izvođen korišćenjem komercijalnog kita ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species proizvođača IDvet (France), dok je VNT izvođen upotrebom kulture ćelija Madin-Darby bovine kidney (MDBK) i virusa bolesti kvrgave kože poreklom od klinički obolelog govečeta u trajanju od 3 dana.</p> <p>Prvo prisustvo specifičnih antitela protiv LSDV u krvnim serumima vakcinisanih krava utvrđeno je 20 dana nakon vakcinacije, najviši nivo serokonverzije utvrđen je 30 dana nakon vakcinacije, a prisustvo antitela je bilo moguće detektovati tokom četiri meseca nakon vakcinacije, modifikovanim VNT kod 34% krava, a ELISA testom kod 30% vakcinisanih krava.</p> <p>Prisustvo specifičnih antitela protiv LSDV ELISA metodom je bilo moguće utvrditi 90 dana nakon teljenja kod 16,67% teladi, 105 dana nakon teljenja kod 10% teladi, a u</p>

poslednjem terminu uzorkovanja, 120 dana nakon teljenja, kod svega 6,67% teladi. VNT je u istim terminima prisustvo specifičnih antitela bilo moguće utvrditi kod 10%, 6,67%, i 3,33% teladi. Ni u jednom terminu uzorkovanja nije bilo moguće utvrditi prisustvo antitela protiv LSDV kod svih ispitanih teladi.

Na dan teljenja je prisustvo specifičnih antitela protiv LSDV utvrđeno u 63,33% uzoraka krvnih seruma krava ELISA metodom, u 73,33% uzoraka krvnih seruma krava metodom VNT, dok je obema metodama prisustvo antitela utvrđeno u 86,67% uzoraka kolostruma. Statističkom analizom je utvrđen značajno veći nivo antitela u kolostralnom u odnosu na krvni serum krava.

Rezultati uporednog ispitivanja modifikovanog VNT i komercijalnog ELISA testa za detekciju antitela protiv LSDV u uzorcima krvnih seruma iz banke seruma i vakcinisanih krava pokazali su skoro savršenu saglasnost poređenih metoda ( $k=0,913$ ). S druge strane, visoka saglasnost poređenih metoda ( $k=0,7239$ ) je postignuta kod uporednog ispitivanja modifikovanog VNT i komercijalnog ELISA testa za detekciju antitela protiv LSDV u uzorcima krvnih seruma vakcinisanih krava i njihove teladi.

Ispitivanjem uzoraka krvnih seruma iz banke seruma goveda pre pojave LSD u Republici Srbiji izračunata je specifičnost modifikovanog VNT od 100%, a komercijalnog ELISA testa od 99,2%. S obzirom da je VNT zlatni standard serološke dijagnostike LSD, izračunata je osetljivost komercijalnog ELISA testa u odnosu na modifikovani VNT za detekciju antitela u uzorcima krvnih seruma vakcinisanih krava od 88,24% i za detekciju antitela protiv LSDV u uzorcima krvnih seruma vakcinisanih krava i njihove teladi od 86,44%.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se modifikovani VNT i komercijalni ELISA test (proizvođača „IDvet“) mogu koristiti za detekciju antitela protiv LSDV. Modifikovani VNT se pokazao kao jednostavniji i brži za izvođenje u odnosu na preporučeni VNT od strane OIE.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	29.11.2018.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Mentor: _____ Prof.dr Dragan Rogan, redovni profesor Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Predsednik: _____ Dr Sava Lazić, naučni savetnik Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad</p> <p>Član: _____ Prof.dr Miodrag Radinović, vanredni profesor Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: _____ Dr Nikolina Novakov, docent Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: _____ Dr Diana Lupulović, naučni saradnik Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad</p>
---	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral dissertation
Author: AU	Milena Samojlović
Mentor: MN	Dragan Rogan, PhD, Full Professor
Title: TI	Comparative examination of antibodies against lumpy skin disease virus by enzyme-linked immunoassay and virus neutralization test
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Physical description: PD	9 chapters / 120 pages / 10 images / 20 tables/ 11 graphs/ 1 shceme/ 1 formula / 149 references / 5 attachments
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Veterinary virology and immunology
Subject, Key words SKW	Lumpy skin disease, cattle, antibodies, ELISA, VNT, immunity, passive immunity
UC	636.09:636.2.084(043.3)
Holding data: HD	Library at Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Lumpy skin disease (LSD) is a viral disease of cattle, very important from an economic aspect, due to significant losses that can cause in livestock production. Rapid and reliable laboratory tests are necessary, both for early detection of disease and determination of the status of the herds, as well as for monitoring of the immune status of individual animals after vaccination, which is still the most effective measure for controlling the spread of LSD. In order to implement effective LSD control measures, such as timely vaccination, particularly in calves and serological monitoring, it is necessary to carry out researches related to postvaccinal immune response, both in adult cattle and in their calves. The goal of this doctoral dissertation is to monitor the presence of antibodies against lumpy skin disease virus (LSDV) in vaccinated cows, to monitor the persistence of maternal antibodies in calves born to vaccinated cow, as well as to carry out the validation process and confirm the use of the modified virus neutralization test developed at the Department of virology of the Scientific veterinary institute "Novi Sad", Serbia.</p> <p>The material for testing used in this study originated from cattle in areas where no LSD outbreaks were registered during the epizootic in Serbia in 2016 (South Bačka, Srem and South Banat Districts), and the vaccination of cattle against LSD started in July 2016. A comparative examination was carried out on a total of 355 cow blood sera samples, 15 colostrum samples and 270 calf blood sera samples. ELISA and virus neutralization test (VNT) were used for comparative examination of samples on the presence of antibodies against LSDV. ELISA test was performed using the commercial set kit ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species manufactured by IDvet (France), while a 3-day VNT was performed using Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell line and LSDV isolated from clinically infected cow.</p> <p>The first presence of specific antibodies against LSDV in vaccinated cows was detected 20 days after vaccination, the highest seroconversion was determined 30 days after vaccination, and the presence of antibodies against LSDV could be detected during four months after vaccination by VNT and commercial ELISA in 34% and 30% of vaccinated cattle, respectively.</p> <p>The presence of specific antibodies against the LSDV by ELISA method could be</p>



determined 90 days after calving in 16.67% of calves, 105 days after calving in 10% of calves, and in the last sampling interval, 120 days after calving, in only 6.67% of calves. In above-mentioned sampling intervals, the presence of specific antibodies by VNT could be determined in 10%, 6.67%, and 3.33% of calves. In any sampling period we did not determined that all calves were seropositive to LSDV.

On calving day, the presence of specific antibodies against LSDV was detected in 63.33% of cow blood sera samples by ELISA, in 73.33% of cow blood sera samples by VNT method, while the presence of antibodies was found in 86.67% of colostrum samples by both methods. A statistical analysis showed a significantly higher level of antibodies in the colostrum compared to the cow blood sera.

The results of comparative examination of modified VNT and commercial ELISA test for the detection of antibodies against LSDV in blood sera samples from the sera bank and of vaccinated cows showed an almost perfect agreement of the compared methods ( $k = 0.913$ ). On the other hand, the substantial agreement of the compared methods ( $k = 0.7239$ ) was achieved in a comparative examination of modified VNT and commercial ELISA test for the detection of antibodies against LSD in blood sera samples of vaccinated cows and their calves.

The specificity of modified VNT and commercial ELISA was 100% and 99.2% respectively. It was calculated by testing blood sera samples from sera bank before the occurrence of LSD in the Republic of Serbia. Since VNT is “the gold standard” serological test for LSDV, the sensitivity of commercial ELISA in relation to modified VNT was calculated for the detection of antibodies in blood sera samples of vaccinated cows of 88.24% and for the detection of antibodies against LSDV in blood sera samples of vaccinated cows and their calves of 86.44%.

The results of this study showed that modified VNT and commercial ELISA manufactured by „IDvet“ can be used for the detection of antibodies against LSDV. Modified VNT proved to be simpler to perform and to take less time compared to the recommended VNT by the OIE.

Accepted on Senate on: AS	29.11.2018
Defended: DE	

Thesis Defend Board:  
DB

Mentor: \_\_\_\_\_  
Dragan Rogan, PhD, Full Professor  
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

President: \_\_\_\_\_  
Sava Lazić, PhD, Principal Research Fellow  
Scientific veterinary institute "Novi Sad", Novi  
Sad

Member: \_\_\_\_\_  
Miodrag Radinović, PhD, Associate Professor  
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: \_\_\_\_\_  
Nikolina Novakov, PhD, Assistant Professor  
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: \_\_\_\_\_  
Diana Lupulović, PhD, Research Associate  
Scientific veterinary institute "Novi Sad", Novi  
Sad

## СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

CaV – Capripoxvirus

EDTA – етилендиаминтетрасирћетна киселина

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

GPV – goatpox virus (вирус богиња коза)

IFAT – indirect fluorescent antibody test

IgG – имуноглобулини класе G

LSD – lumpy skin disease (болест квргаве коже)

LSDV – lumpy skin disease virus (вирус болести квргаве коже)

MDBK – Madin Darby bovine kidney (култура ћелија говеђег бубрега)

MHC – major histocompatibility complex (главни комплекс хистокompatибилности)

NK – Natural killer (ћелије убице)

OD – optical density (оптичка густина)

OIE – Office International des Epizooties (The World Organization for Animal Health)

PCR – polymerase chain reaction (ланчана реакција полимеразе)

S/P – serum to positive ratio (однос вредности OD серума и позитивне контроле)

SPV – sheeppox virus (вирус богиња оваца)

TCID<sub>50</sub> – tissue culture infective dose (инфективна доза за 50% културе ткива)

АГИД – агар гел имунодифузија

ВНТ – вирус неутрализациони тест

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

EGFP – enhanced green fluorescent protein

иРНК – информациона РНК

НИВ-НС – Научни институт за ветеринарство ”Нови Сад”

РНК – рибонуклеинска киселина

ЦПЕ – цитопатогени ефекат

## САДРЖАЈ

Кратак садржај.....	i
Summary.....	iii
<b>1. УВОД.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Историјат и распрострањеност болести квргаве коже говеда.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Етиологија .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Таксономија.....	7
2.2.2. Морфологија, организација генома и репликација.....	10
2.2.3. Особине вируса.....	14
<b>2.3. Епизоотиологија.....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Морбидитет и морталитет.....	15
2.3.2. Пријемчиве врсте животиња – преживара.....	16
2.3.3. Преношење.....	16
<b>2.4. Патогенеза.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5. Клиничка слика.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6. Патоморфолошке и патохистолошке промене.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7. Имунитет.....</b>	<b>25</b>
<b>2.8. Дијагностичке методе болести квргаве коже.....</b>	<b>28</b>
2.8.1. Изолација вируса.....	29
2.8.2. Молекуларне методе дијагностике - PCR i <i>real time</i> PCR.....	30
2.8.3. Серолошке методе дијагностике.....	32
<b>2.9. Економски аспект и контрола болести.....</b>	<b>34</b>
<b>3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>38</b>
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Материјал.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Узорци крвних серума говеда из банке серума Научног института за ветеринарство „Нови Сад“ .....	41
4.1.2. Узорци крвних серума вакцинисаних крава.....	41
4.1.3. Узорци крвних серума и колострума вакцинисаних крава и узорци крвних серума њихове телади.....	42
4.1.4. Материјали коришћен за извођење ELISA методе.....	42
4.1.5. Материјали коришћен у методи титрације вируса и вирус неутрализационог теста.....	43
<b>4.2. Методе.....</b>	<b>44</b>
4.2.1. Припрема крвних и колостралних серума.....	44
4.2.2. Комерцијални ELISA сет кит - <i>ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species</i> .....	45
4.2.3. Умножавање вируса болести квргаве коже и модификовани вирус неутрализациони тест.....	47

4.2.4.	Статистичка обрада података.....	50
<b>5.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.</b>	<b>Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума говеда из банке серума Научног института за ветеринарство "Нови Сад".....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.</b>	<b>Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума вакцинисаних крава.....</b>	<b>52</b>
5.2.1.	Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава ELISA методом.....	55
5.2.2.	Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава методом ВНТ.....	59
<b>5.3.</b>	<b>Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвних серума њихове телади.....</b>	<b>64</b>
5.3.1.	Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава и њихове телади ELISA методом.....	68
5.3.2.	Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава и њихове телади методом ВНТ.....	73
<b>5.4.</b>	<b>Упоредно испитивање метода ELISA и вирус неутрализациони тест за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>83</b>
<b>6.1.</b>	<b>Модификовани вирус неутрализациони тест.....</b>	<b>84</b>
<b>6.2.</b>	<b>Испитивање присуства антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума из банке серума Научног института за ветеринарство "Нови Сад" и вакцинисаних крава.....</b>	<b>85</b>
<b>6.3.</b>	<b>Испитивање присуства антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвних серума њихове телади.....</b>	<b>92</b>
<b>6.4.</b>	<b>Испитивање специфичности и осетљивости метода ELISA и вирус неутрализациони тест за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже.....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>КОРИШЋЕНА ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>111</b>
9.1.	Прилог 1. Подаци о кравама из банке серума НИВ-НС.....	111
9.2.	Прилог 2. Подаци о вакцинисаним кравама.....	113
9.3.	Прилог 3. Технологија узгоја телади на Фарми 1.....	117
9.4.	Прилог 4. Технологија узгоја телади на Фарми 2.....	118
9.5.	Прилог 5. Подаци о вакцинисаним кравама и њиховој телади на Фарми 1 и Фарми 2.....	119

## Упоредно испитивање антитела против вируса болести квржаве коже имуноензимским и вирус неутрализационим тестом

### Кратак садржај

Болест квржаве коже (lumpy skin disease – LSD) је вирусно обољење говеда, веома важно са економског аспекта, због великих губитака у говедарској производњи. Брзи и поуздани лабораторијски тестови су неопходни, како за рано откривање болести и утврђивање статуса запата, тако и за праћење имунолошког статуса јединки након вакцинације, која је и даље најсигурнија мера у борби против ове болести. Ради спровођења ефикасних мера контроле против LSD, као што су правовремена вакцинација, нарочито телади и серолошки надзор запата, неопходно је вршити истраживања везана за поствакцинални имунолошки одговор, како код одраслих јединки, тако и код телади. Циљ ове докторске дистертације је праћење антитела против вируса болести квржаве коже (lumpy skin disease virus – LSDV) код вакцинисаних крава, праћење перзистенције матерналних антитела код телади пореклом од вакцинисаних крава, као и спровођење поступка валидације и потврде примене модификованог вирус неутрализационог теста развијеног на Одељењу за вирусологију Научног института за ветеринарство „Нови Сад“, Република Србија.

Материјал за испитивање коришћен у овом истраживању потиче од говеда са подручја у којима није регистрована болест током епизоотије у Србији 2016. године (Јужнобачки, Сремски и Јужнобанатски округ), а вакцинација говеда против болести квржаве коже је почела да се спроводи током јула месеца 2016. године. Упоредно испитивање је извршено на укупно 355 узорака крвних серума крава, 15 узорака колострума и 270 узорака крвних серума телади. За упоредно испитивање присуства антитела против LSDV у узорцима коришћене су методе ELISA и вирус неутрализациони тест (ВНТ). ELISA тест је извођен коришћењем комерцијалног кита *ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species* произвођача *IDvet* (France), док је ВНТ извођен употребом културе ћелија *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK) и вируса болести квржаве коже пореклом од клинички оболелог говечета у трајању од 3 дана.

Прво присуство специфичних антитела против LSDV у крвним серумима вакцинисаних крава утврђено је 20 дана након вакцинације, највиши ниво сероконверзије утврђен је 30 дана након вакцинације, а присуство антитела је било могуће детектовати током четири месеца након вакцинације, модификованим ВНТ

код 34% крава, а ELISA тестом код 30% вакцинисаних крава.

Присуство специфичних антитела против LSDV ELISA методом је било могуће утврдити 90 дана након тељења код 16,67% телади, 105 дана након тељења код 10% телади, а у последњем термину узорковања, 120 дана након тељења, код свега 6,67% телади. ВНТ је у истим терминима присуство специфичних антитела било могуће утврдити код 10%, 6,67%, и 3,33% телади. Ни у једном термину узорковања није било могуће утврдити присуство антитела против LSDV код свих испитаних телади.

На дан тељења је присуство специфичних антитела против LSDV утврђено у 63,33% узорака крвних серума крава ELISA методом, у 73,33% узорака крвних серума крава методом ВНТ, док је обема методама присуство антитела утврђено у 86,67% узорака колострума. Статистичком анализом је утврђен значајно већи ниво антитела у колостралном у односу на крвни серум крава.

Резултати упоредног испитивања модификованог ВНТ и комерцијалног ELISA теста за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума из банке серума и вакцинисаних крава показали су скоро савршену сагласност поређених метода ( $k=0,913$ ). С друге стране, висока сагласност поређених метода ( $k=0,7239$ ) је постигнута код упоредног испитивања модификованог ВНТ и комерцијалног ELISA теста за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади.

Испитивањем узорака крвних серума из банке серума говеда пре појаве LSD у Републици Србији израчуната је специфичност модификованог ВНТ од 100%, а комерцијалног ELISA теста од 99,2%. С обзиром да је ВНТ златни стандард серолошке дијагностике LSD, израчуната је осетљивост комерцијалног ELISA теста у односу на модификовани ВНТ за детекцију антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава од 88,24% и за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади од 86,44%.

Резултати овог истраживања су показали да се модификовани ВНТ и комерцијални ELISA тест (произвођача „IDvet“) могу користити за детекцију антитела против LSDV. Модификовани ВНТ се показао као једноставнији и бржи за извођење у односу на препоручени ВНТ од стране OIE.

# **Comparative examination of antibodies against lumpy skin disease virus by enzyme-linked immunoassay and virus neutralization test**

## Summary

Lumpy skin disease (LSD) is a viral disease of cattle, very important from an economic aspect, due to significant losses that can cause in livestock production. Rapid and reliable laboratory tests are necessary, both for early detection of disease and determination of the status of the herds, as well as for monitoring of the immune status of individual animals after vaccination, which is still the most effective measure for controlling the spread of LSD. In order to implement effective LSD control measures, such as timely vaccination, particularly in calves and serological monitoring, it is necessary to carry out researches related to postvaccinal immune response, both in adult cattle and in their calves. The goal of this doctoral dissertation is to monitor the presence of antibodies against lumpy skin disease virus (LSDV) in vaccinated cows, to monitor the persistence of maternal antibodies in calves born to vaccinated cow, as well as to carry out the validation process and confirm the use of the modified virus neutralization test developed at the Department of virology of the Scientific veterinary institute "Novi Sad", Serbia.

The material for testing used in this study originated from cattle in areas where no LSD outbreaks were registered during the epizootic in Serbia in 2016 (South Bačka, Srem and South Banat Districts), and the vaccination of cattle against LSD started in July 2016. A comparative examination was carried out on a total of 355 cow blood sera samples, 15 colostrum samples and 270 calf blood sera samples. ELISA and virus neutralization test (VNT) were used for comparative examination of samples on the presence of antibodies against LSDV. ELISA test was performed using the commercial set kit *ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species* manufactured by IDvet (France), while a 3-day VNT was performed using Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell line and LSDV isolated from clinically infected cow.

The first presence of specific antibodies against LSDV in vaccinated cows was detected 20 days after vaccination, the highest seroconversion was determined 30 days after vaccination, and the presence of antibodies against LSDV could be detected during four months after vaccination by VNT and commercial ELISA in 34% and 30% of vaccinated cattle, respectively.

The presence of specific antibodies against the LSDV by ELISA method could be



determined 90 days after calving in 16.67% of calves, 105 days after calving in 10% of calves, and in the last sampling interval, 120 days after calving, in only 6.67% of calves. In above-mentioned sampling intervals, the presence of specific antibodies by VNT could be determined in 10%, 6.67%, and 3.33% of calves. In any sampling period we did not determine that all calves were seropositive to LSDV.

On calving day, the presence of specific antibodies against LSDV was detected in 63.33% of cow blood sera samples by ELISA, in 73.33% of cow blood sera samples by VNT method, while the presence of antibodies was found in 86.67% of colostrum samples by both methods. A statistical analysis showed a significantly higher level of antibodies in the colostrum compared to the cow blood sera.

The results of comparative examination of modified VNT and commercial ELISA test for the detection of antibodies against LSDV in blood sera samples from the sera bank and of vaccinated cows showed an almost perfect agreement of the compared methods ( $k = 0.913$ ). On the other hand, the substantial agreement of the compared methods ( $k = 0.7239$ ) was achieved in a comparative examination of modified VNT and commercial ELISA test for the detection of antibodies against LSD in blood sera samples of vaccinated cows and their calves.

The specificity of modified VNT and commercial ELISA was 100% and 99.2% respectively. It was calculated by testing blood sera samples from sera bank before the occurrence of LSD in the Republic of Serbia. Since VNT is “the gold standard” serological test for LSDV, the sensitivity of commercial ELISA in relation to modified VNT was calculated for the detection of antibodies in blood sera samples of vaccinated cows of 88.24% and for the detection of antibodies against LSDV in blood sera samples of vaccinated cows and their calves of 86.44%.

The results of this study showed that modified VNT and commercial ELISA manufactured by „IDvet“ can be used for the detection of antibodies against LSDV. Modified VNT proved to be simpler to perform and to take less time compared to the recommended VNT by the OIE.

## 1. УВОД

Болест квргаве коже (нодуларни дерматитис, lumpy skin disease - LSD) је вирусно обољење говеда и неких врста дивљих преживара. Болест је веома важна са економског аспекта, због великих губитака у говедарској производњи, нарочито код говеда која претходно нису била изложена вирусу болести квргаве коже. Због значајног економског утицаја и брзине ширења болест се налази на листи болести обавезних за пријављивање Светској здравственој организацији за здравље животиња (The World Organization for Animal Health - Office International des Epizooties - OIE). Појава болести је до скоро била везана искључиво за афрички континент, где се у многим земљама јавља ендемично. Од 1989. године, када је болест први пут пријављена ван афричког континента у Израелу, болест се региструје и у другим земљама Блиског Истока. Болест квргаве коже је први пут пријављена у Турској 2013. године, одакле се 2015. и 2016. године шири у југоисточну Европу, односно у земље Балканског полуострва. У Републици Србији се болест први пут појавила почетком јуна 2016. године.

Узрочник обољења је вирус који припада фамилији *Poxviridae*, подпородици *Chordopoxvirinae*, а заједно са вирусима богиња оваца и коза сврстан је у род *Capripoxvirus*. То је велики ДНК вирус, веома отпоран у спољашњој средини, који на умереним температурама у осушеним крастама или простирци може задржати инфективност дуго времена.

Вирус се преноси хематофагним инсектима, као механичким векторима. Међутим, у срединама где је распрострањеност механичких вектора мала такође може доћи до преношења болести, што указује на могућност директног или индиректног контакта као извора преношења инфекције. Болест квргаве коже карактерише појава грознице, чворова на кожи и унутрашњим органима, пад млечности, стерилитет код бикова, побачаји код крава, и у неким случајевим смрт. Клинички симптоми су најизраженији код млечних говеда на врху лактације и код младих животиња, док је могућа појава и субклиничке инфекције. Морталитет је углавном низак до 10%, док морбидитет варира од 5% до 45%, а може бити и већи код европских раса говеда.

Патогенеза болести квргаве коже се карактерише инкубационим периодом од 1 до 5 недеља у природним условима држања, док после инокулације вируса вештачким путем износи од 6 до 9 дана до појаве грознице и првих клиничких

знакова. Након уласка вируса у организам домаћина, репликација вируса се одвија у крви и ћелијама коже, а виремија се може детектовати од 6. дана после инфекције. Виремија у просеку траје око 9 дана, а максимално две недеље. Вирус се може наћи у носним, оралним и секретима коњуктива најмање 7 дана по престанку виремичке. Карактеристично за болест крвгаве коже је да говеда могу бити виремична и у одсуству клиничке болести, и учествовати у ширењу вируса.

Вакцинација говеда против болести крвгаве коже се показала као најефикаснија мера спречавања ширења болести у зараженим подручјима. Тренутно су доступне само живе атенуиране вакцине. Ниво антитела у крви вакцинисаних говеда и говеда са слабо израженим клиничким симптомима је често веома низак, те га није могуће детектовати доступним серолошким методама. Сматра се да пасивни имунитет код телади рођених од имунизованих крава перзистира до шест месеци. За утврђивање присуства антитела против вируса болести крвгаве коже користе се вирус неутрализациони тест, агар гел имунодифузија, тест индиректне имунофлуоресценције, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) и Western blot. Вирус неутрализациони тест се сматра златним стандардом међу серолошким тестовима, јер је најспецифичнији, док је ELISA тест брз и једноставан за употребу. Због велике антигенске сличности серолошким тестовима није могуће разликовати инфекције узроковане вирусима из рода *Capripoxvirus*.

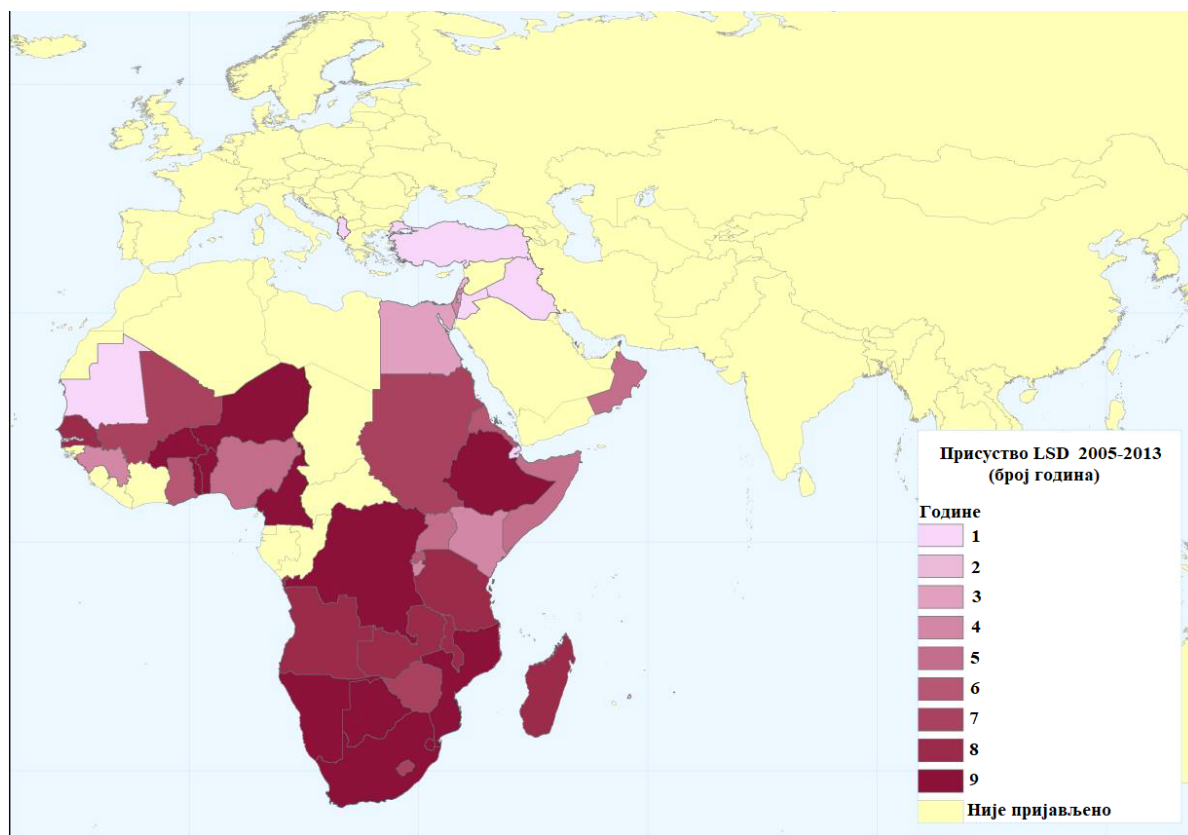
С обзиром да је болест крвгаве коже дуго година била ограничена само на афрички континент, постоји недовољно података везаних за серолошку дијагностику, као и перзистенцију матерналних антитела код телади пореклом од вакцинисаних крава. Брза и поуздана лабораторијска дијагностика је неопходна за рано откривање и праћење нових појава ове болести, као и за праћење успеха вакцинације. Имајући у виду да су највећи губици узроковани болешћу крвгаве коже код најмлађих категорија говеда, испитивање и праћење перзистенције матерналних антитела код телади пореклом од вакцинисаних крава омогућиће прецизније одређивање времена вакцинације телади, као једне од најважнијих мера у борби против ове болести. Наша испитивања везана за модификацију вирус неутрализационог теста, праћење вакциналног статуса говеда, као и испитивања перзистенције матерналних антитела допринеће развоју брже и једноставније серолошке дијагностике, могућности њене шире примене у контроли и ерадикацији болести крвгаве коже, као и бољем разумевању матерналног имунитета код телади.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. ИСТОРИЈАТ И РАСПРОСТРАЊЕНОСТ БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ

Појава болести квргаве коже (lumpy skin disease - LSD) је до скоро била везана искључиво за афрички континент, где се у многим земљама појављује ендемично. Болест се први пут јавила у Замбији (бивша Северна Родезија) 1929. године, одакле се током неколико деценија проширила на већину земаља афричког континента. Не јавља се у Либији, Алжиру, Мароку и Тунису (Turpurainen и Oura, 2012). Између 1943. и 1945. године нови случајеви болести су се јавили у Боцвани, Зимбабвеу (бивша Јужна Родезија) и Јужноафричкој Републици, када је и препозната заразна природа болести. Панзоотија у Јужноафричкој Републици је трајала до 1949. године, где је изазвала огромне економске губитке и захватила око осам милиона говеда. (Davies, 1991). У источној Африци се LSD јавља први пут у Кенији 1957. године, у Судану 1972. године, а у западну Африку се шири 1974. године, када се јављају случајеви болести у Нигерији. 1977. године болест се јавља и у Мауританији, Малију, Гани и Либерии. Први случајеви болести у Сомалији се појављују 1983. године, док се од 1981. до 1988. године LSD јавља у Танзанији, Кенији, Зимбабвеу, Камеруну, Сомалији и Етиопији. (House, 1990; Davies 1991a, 1991b; OIE, 2018). Појава LSD је дуго била ограничена на земље субсахарске Африке, све док се у мају 1988. године није појавила у Египту у карантинској станици међу говедима увезеним из јужних земаља (Слика 1). Било је захваћено 22 од укупно 26 египатских губернија, а болест је сузбијена вакцинацијом скоро два милиона говеда вакцином против овчијих богиња, са укупним губицима од 1449 грла. Захваљујући спроведеној вакцинацији, морбидитет током ове епизоотије је износио само 2% (Ali и сар., 1990; House, 1990; Salib и Osman, 2011). Нови случајеви болести су пријављени у Египту 2006. године (Kumar, 2011). На афричком континенту скорашње избијање LSD се везује за област Централне Етиопије, где је од 2007. године до 2011. године пријављено укупно 62.176 случајева болести и 4.372 угинућа (Ayelet и сар., 2014).

Слика 1. Распрострањеност LSD на афричком континенту и Блиском Истоку током 2005-2013 године. (EFSA, 2015)

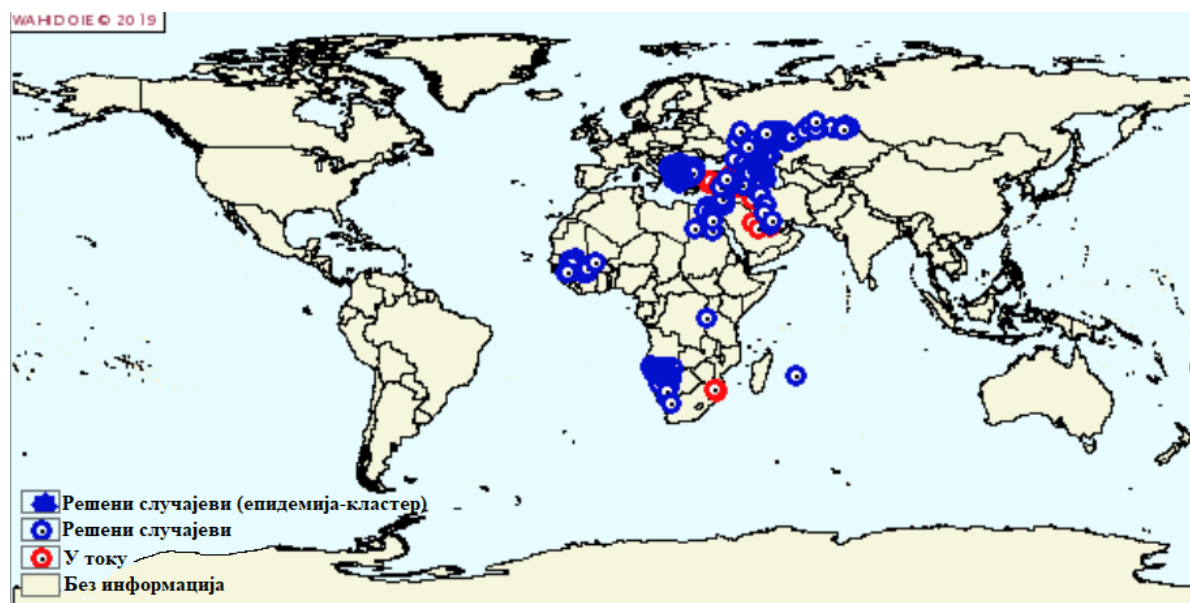


преузето са: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3986>

На Средњем Истоку LSD се јавља у неколико наврата, у Оману 1984. и 2009. године, Кувајту 1986. и 1991., Израелу 1989. и 2006. године, Бахреину 1993. и 2002.-2003., Уједињеним Арапским Емиратима 2000. године (Tageldin и сар., 2014; Kumar, 2011). Појава болести у Израелу 1989. године је сузбијена клањем свих зарежених говеда, као и говеда која су била у контакту са зараженим говедима. Спроведена је вакцинација са вакцином против вируса овчијих богиња, што је такође довело до ограниченог ширења заразе (Al-Salihi, 2014). У Оману је 2009. године дошло до поновног појављивања LSD на фарми капацитета 3200 Холштајн говеда, са морбидитетом од 30-45%, а морталитетом 12% (Tageldin, 2014). Од 2012. до 2014. године, пријављено је 293 појаве болести у Израелу, 34 појаве болести у Либану, 2 појаве болести у Јордану, 28 појава болести у Ираку, 236 појава болести у Турској и две појаве болести у Азербејџану (Слика 2) (EFSA, 2015). У Јордану је појава болести пријављена код два одрасла говечета млечног типа на граници са Израелом и Сиријом. Укупан морбидитет је износио 26%, а морталитет 1,9%, док је леталитет износио 7,5% (Abutarbush и сар., 2015). У Ирану је болест пријављена у два села у

западном делу државе, код шест грла млечног типа. Као могући извор заразе наводи се нелегална трговина стоком и кретање вектора (Al-Sahili, 2014). Болест се у Турској сада сматра ендемичном, а највероватније је дошла из Сирије и Ирака, јер је већина пријављених случајева болести била везана за погранична подручја (EFSA, 2015).

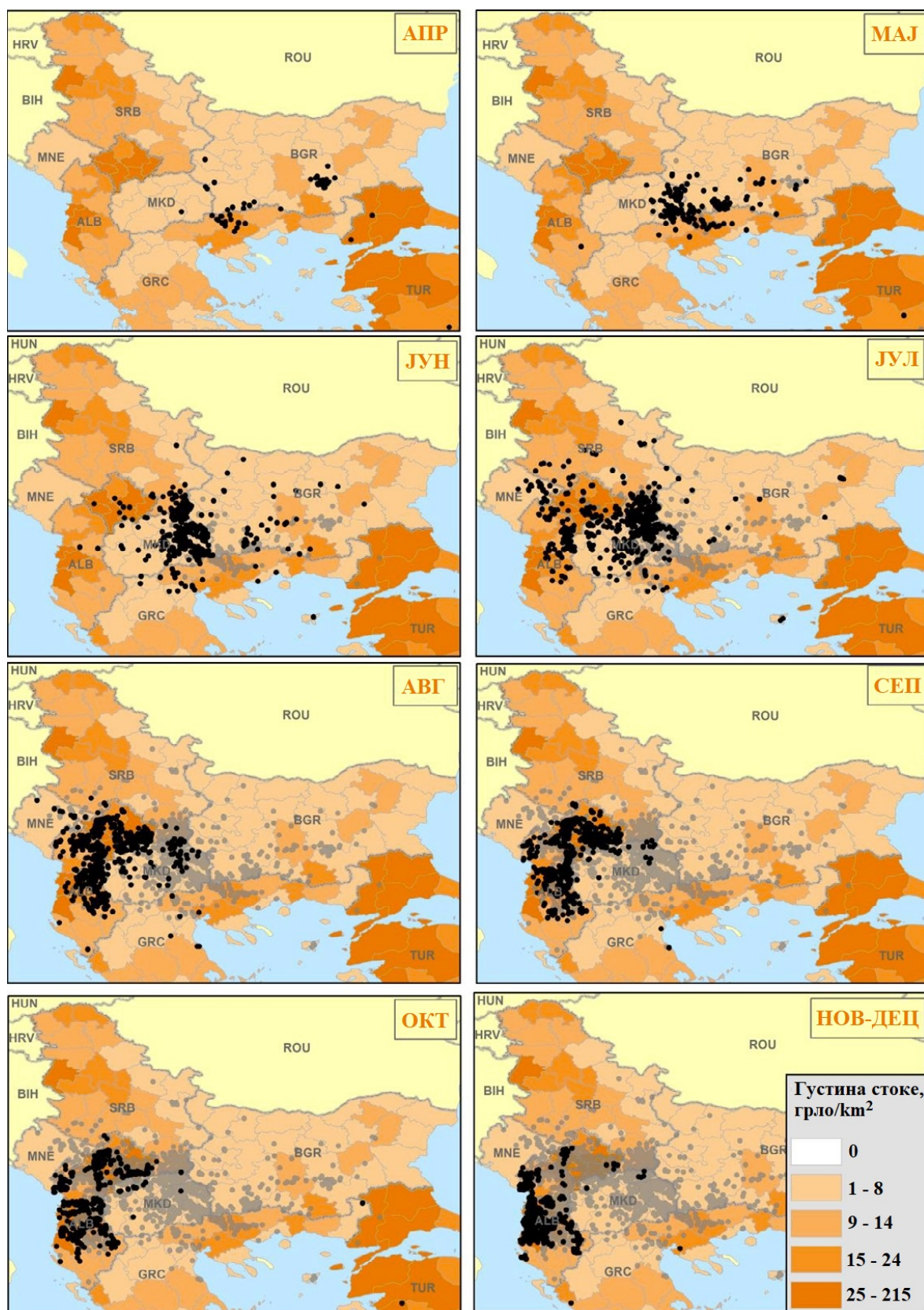
Слика 2. Регистровани случајеви појаве болести квржаве коже у свету у периоду 2005-2019. године (OIE WAHIS 2005-2019)



преузето са: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps)

Крајем 2014. године болест је потврђена на Кипру. Током 2015. године болест се ширила Турском (Источном Тракијом), све до Грчке (до Солуна и Халкидикија). У 2016. години, болест се опет појавила у Грчкој у области према граници са Бугарском, која није адекватно била покривена вакцинацијом. Током 2016. године болест се први пут јавила у Бугарској, Албанији, Србији, Северној Македонији и Црној Гори (Слика 3) (EFSA, 2017). Са источне стране Црног мора болест се проширила у Јерменију, Азербејџан, Казахстан, Грузију и Русију. Морбидитет у Албанији је износио 48%, са укупно 6.235 клиничких случајева болести. У Бугарској је болест захватила 17 од 28 провинција. (EFSA, 2017). Током 2016. године на Балканском полуострву пријављено је 7.483 случајева болести са 12.330 оболелих животиња, док је током 2017. године пријављено само 385 случајева болести са 850 оболелих животиња. У 2017. години највише пријављених случајева LSD било је у Албанији, где није у потпуности завршен план спровођења вакцинације, са неколико случајева болести у Грчкој и Северној Македонији (EFSA, 2018).

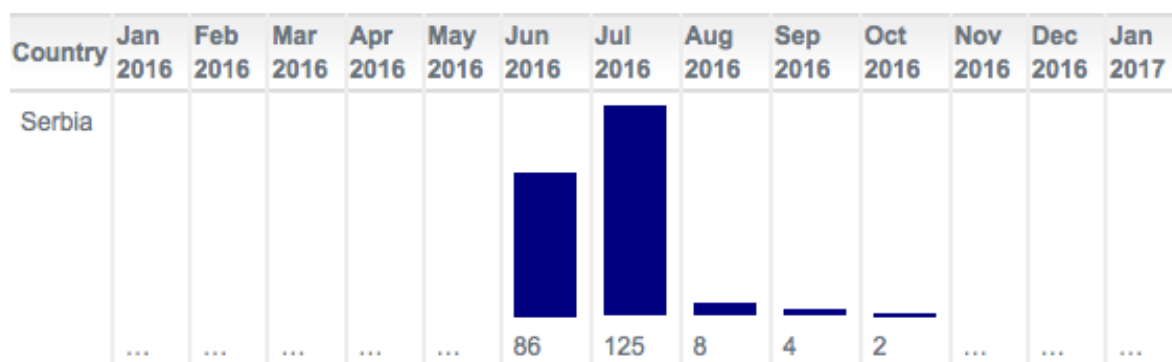
Слика 3. Појава случајева LSD на Балкану 2016. године у односу на густину насељености говеда. Црна поља означавају нове случајеве, а сива претходне случајеве појаве болести крваве коже (EFSA, 2017).



преузето са: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4773>

У Србији се први случај LSD јавио 04. јуна 2016. године у селу Љиљанци, општина Бујановац. Последњи случај болести је пријављен 01. октобра 2016. Укупно је пријављено 225 случајева болести, а оболело је 267 грла стоке, са просечним морбидитетом унутар крда од 20% (Слика 4). У Пчињском округу је забележен највећи број случајева болести (EFSA, 2017; Toplak и сар., 2018).

Слика 4. Приказ пријава болести квергаве коже у Србији од јануара 2016. до јануара 2017. године. (OIE WAHIS 2016)



преузето са: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Diseasetimeseries](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Diseasetimeseries)

## 2.2. ЕТИОЛОГИЈА

### 2.2.1. Таксономија

Изучавање *Poxviridae* има дугу историју која обухвата и Џенеров рад на проналажењу вакцине против великих богиња. Две стотине година касније, велике богиње су искорењене. Достигнуће од изузетног значаја, не само да је уклонило опасну болест по човечанство, већ је и показало ефикасност општег принципа вакцинације у борби против заразних болест (Mercer и сар., 2007).

Породица *Poxviridae* се састоји од две подпородице *Chordopoxvirinae* (вируси кичмењака) и *Entomopoxvirinae* (вируси инсеката). Подпородица *Chordopoxvirinae* се састоји од 11 родова: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Centapoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus* (ICTV, 2018). Сваки род са изузетком *Molluscipoxvirus* укључује врсте које изазивају болести код домаћих, дивљих или



лабораторијских животиња. Подпородица *Entomopoxvirinae* се састоји од 3 рода: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus* (Mercer и сар., 2007). Постоје и други припадници породице *Poxviridae* који нису класификовани (*Pteropox virus*, *Squirrelpox virus*), а нови припадници ове породице вируса константно се откривају, укључујући изолате из разних животињских врста, као што су жабе, гуштери, јелени, кенгури и други (Murphy и сар., 1999; Maclachlan и Dubovi, 2010).

Табела 1. Таксономија вируса из подпородице *Chordopoxvirinae* (ICTV, 2018)

<b>Chordopoxvirinae</b>		
<b>Род</b>	<b>Вирус</b>	<b>Домаћин</b>
<b>Avipoxvirus</b>	Canarypox virus	
	Fowlpox virus	
	Juncopox virus	
	Mynahpox virus	
	Pigeonpox virus	кокошке, ћурке, друге птице
	Psittacinepox virus	
	Quailpox virus	
	Sparrowpox virus	
	Starlingpox virus	
<b>Capripoxvirus</b>	Turkeypox virus	
	Goatpox virus	козе, овце
	Lumpy skin disease virus	говеда, буфало
<b>Cervidpoxvirus</b>	Sheeppox virus	овце, козе
	Yokapox virus	мишеви
<b>Crocodylidpoxvirus</b>	Mule deerpox virus	јелени
<b>Leporipoxvirus</b>	Nile crocodilepox virus	врсте из рода <i>Crocodylia</i>
	Hare fibroma virus	европски кунџ
	Myxoma virus	зечеви
	Rabbit fibroma virus	зечеви, кунџи
<b>Molluscipoxvirus</b>	Squirrel fibroma virus	сива, црвена и лисичја веверица
	Molluscum contagiosum virus	људи

<b>Orthopoxvirus</b>	Camelpox virus	камиле
	Cowpoxvirus	говеда, људи, пацови, мачке, гербили, велики фелиди, слонови, носорози, окапи
	Ectromelia virus	мишеви, пољски мишеви
	Monkeypox virus	мајмуни, веверице, човеколики мајмуни, мравоједи, људи
	Raccoonpox virus	ракуни
	Skunkpox virus	твор
	Taterapox virus	гербили
	Vaccinia virus	људи, говеда, буфало, свиње, зечеви
Variola virus	људи	
<b>Parapoxvirus</b>	Bovine popular stomatitis virus	говеда, људи
	Orf virus	овце, козе, људи
	Parapoxvirus of red deer in New Zealand	црвени јелен
	Pseudocowpoxvirus	говеда, људи
<b>Suipoxvirus</b>	Swinepox virus	свиње
<b>Yatapox virus</b>	Tanapox virus	мајмуни, људи
	Yaba monkey tumor virus	мајмуни, људи
	Pteropox virus	мала црвена летећа лисица
	Squirrelpox virus	црвена и сива веверица

Род *Capripoxvirus* (CaV) се састоји од вируса болести квржаве коже (lumpy skin disease virus – LSDV), вируса богиња оваца (sheerpox virus – SPV) и вируса богиња коза (goatpox virus – GPV) (ICTV, 2018). Инфекције CaV-има су специфичне за одређену врсту домаћина и имају одређену географску дистрибуцију, са тенденцијом ширења (Tulman и сар., 2001). Серолошким методама није могуће разликовати инфекције изазване вирусима из рода CaV, вируси из овог рода стварају хетерологни унакрсни заштитни имунитет, а у неким експерименталним условима могу и да изазову унакрсну инфекцију (Carn, 1993; Tulman и сар., 2001). Анализа рестриктивних фрагмената и подаци везани за ограничену секвенцу ДНК подржавају мишљење о

блиској вези између CaV-a (Gershon и Black, 1988; Tulman и сар., 2001). Вируси унутар рода CaV су 97% идентични на нивоу нуклеотида, док су филогенетски различити један од другог, јер имају разлике у нуклеотидима специфичним за врсту који одређују опсег врста домаћина (Tulman и сар., 2002).

Инфекције изазване CaV-има код домаћих преживара су изузетно значајне са економског аспекта у одређеним деловима света (Tulman и сар., 2002).

### 2.2.2. Морфологија, организација генома и репликација

*Poxviridae* припадају ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина) вирусима и спадају међу највеће вирусе. Већина вируса из ове породице имају облик цигле (четвртаст), величине 250 x 200 x 200 nm (Murphy и сар., 1999). Немају изометрични нуклеокапсид ни икозаедарну ни хеликалну симетрију које се могу наћи код већине других вируса, па се за ове вирусе каже да су комплексне симетрије. Вириони већине вируса из породице *Poxviridae* су састављени од спољашњег слоја тубуларних структура, распоређених прилично неправилно, дајући им карактеристичан изглед. Имају спољашњи омотач од липопротеина. Омотач обавија централно језгро и два латерална тела непознате улоге. Језгро садржи нуклеинску киселину вируса окружену двоструком протеинском мембраном. Вирион који се ослобађа из ћелије пупљењем, садржи додатни омотач од ћелијских липида и неколико вирус-специфичних протеина, за разлику од вириона који се ослобађа деструкцијом ћелије и не садржи додатни омотач. Вирион без омотача је групни нуклеопротеински антиген, заједнички за све вирусе ове породице. И вирион са омотачем и вирион без омотача је инфективан, с тим што вириони са омотачем лакше инвадирају ћелије и сматрају се важнијим приликом дисеминације вируса кроз организам животиње (Murphy и сар., 1999; MacLachlan и Dubovi, 2010).

CaV-ни вирион је четвртастог облика, прекривен кратким тубуларним елементима и величине око 290 x 270 nm .

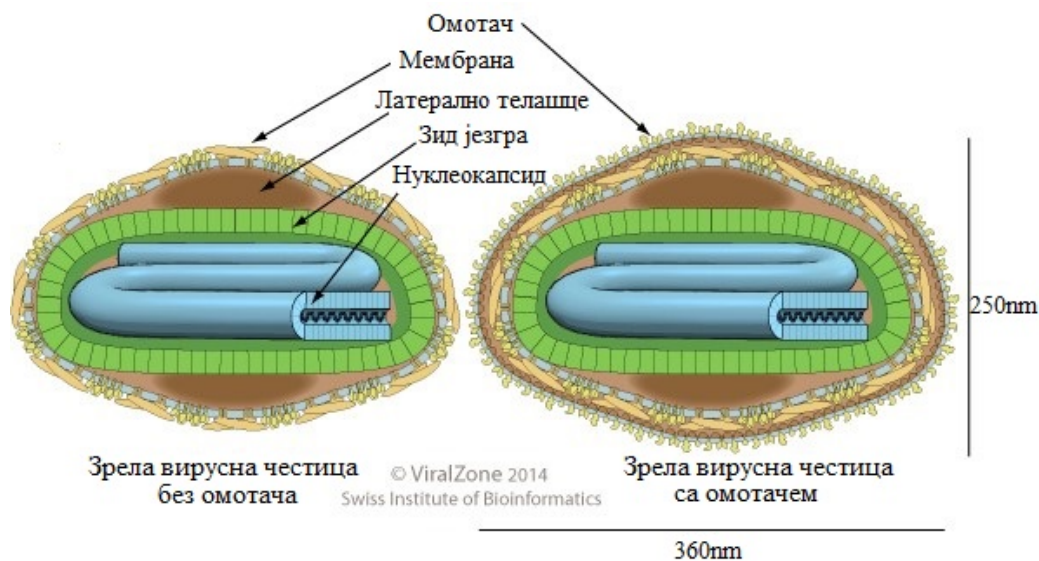
Вирусни геном садржи један молекул линеарне дволанчане ДНК са крајевима повезаним ковалентним везама. Вируси из породице *Poxviridae* кодирају око 200 протеина, од којих се 100 налазе у вириону. Већина протеина са познатим функцијама су ензими укључени у синтезу нуклеинске киселине и структурних компоненти вириона (ДНК полимеразе, ДНК лигаза, РНК полимеразе, тимидин киназа) (Murphy и

сар., 1999). Велики ДНК вируси такође кодирају и многе додатне протеине, назване вирокинима, који не регулишу циклус репликације вируса, али утичу на одговор домаћина на инфекцију. Ови имуномодулаторни протеини укључују инхибиторе комплемент и серинске протеазе, протеине који утичу на активност хемокина и цитокина, као и протеине који утичу на активности урођеног имунитета - интерферон-индуковану антивирусну отпорност. Својим утицајем на одговор и активност хемокина имуномодулаторни протеини спречавају миграцију леукоцита на место инфекције (Maclachlan и Dubovi, 2010). Такође вируси из породице *Poxviridae* садрже значајан број гена (преко 40% свих гена) који нису неопходни за репликацију вируса у ћелији. Сматра се да је већина ових гена значајна за преживљавање вируса у природи (Mercer и сар., 2007).

Већина вируса из породице *Poxviridae* брзо се умножава на култури ћелија. Такође изазивају појаву карактеристичних "рох" промена на хориоалантоисној мембрани ембрионираних кокошијих јаја. *Poxviridae* се репликују у цитоплазми ћелије и стварају интрацитоплазматске инклузије. У вириону садрже сопствене транскриптазе (ДНК-зависне РНК полимеразе) и самодовољни су за репликацију вирусне ДНК. Њихови веома велики геноми кодирају бројне друге ензиме и тако их стварају практично независним од једра ћелије (Murphy и сар., 1999). Моноцистронска иРНК транскриптована је директно са вирусне ДНК (Mercer и сар., 2007). Репликација вируса почиње после спајања екстрацелуларног вириона са омотачем са мембраном ћелије, или после ендоцитозе када се језгро вириона отпушта у цитоплазму где се ослобађа омотача (Maclachlan и Dubovi, 2010). Унутар ендоцитне везикуле долази до лизе омотача, а вирион се отпушта у цитоплазму ћелије домаћина тако што долази до фузије спољашње мембране вириона и мембране везикуле (Maclachlan и Dubovi, 2010). Вирион без омотача улази у ћелију домаћина путем макропиноцитозе. Процес подсећа на уклањање апоптотичних ћелија од стране фагоцита, а окидач представља вирусни површински протеин фосфатидилсерин. За иницијацију процеса неопходна је активација ћелијске p21-активираних киназа од стране вируса (Mercer и Helenius, 2008). Репликација вируса из породице *Poxviridae* се одвија у три фазе. У раној фази, репликацију вируса иницира отпуштање енизима транскриптазе из вириона у цитоплазму ћелије. Током првог ослобађања вируса од омотача, спољашњи омотач и мембрана нестају и вирион се отпушта у цитоплазму. Тада започиње транскрипција вирусне иРНК, која доводи до синтезе полипептида за друго ослобађање вириона. (Buller и Palumbo, 1991). Током интермедијарне фазе

репликације, почиње синтеза вирусне ДНК, копиране из генома родитељског вируса. У финалној фази репликације, која почиње 2 до 48 сати након инфекције, врши се транскрипција касних вирусних гена, и што доводи до синтезе нових вирусних структурних протеина и склапања вирусне партикуле (Maclachlan и Dubovi, 2010). Транскрипцију карактерише каскада у којој транскрипција сваке темпоралне класе гена (рани, средњи и касни гени) захтева присуство специфичних транскрипцијских фактора које стварају претходне темпоралне класе гена. Транскрипцијски фактори за средње гене су кодирани од стране раних гена, док су транскрипцијски фактори за касне гене кодирани од стране средњих гена. Транскрипцију иницира вирусна транскриптаза и други фактори из језгра вириона који омогућавају продукцију иРНК унутар неколико минута после инфекције. Протеини настали транслацијом ових иРНК завршавају уклањање језгра и транскрипцију око 100 раних гена. Све се ово дешава пре него што почне синтеза вирусне ДНК. У ране протеине спадају ДНК полимеразе, тимидин киназа, и неколико других ензима неопходних за репликацију генома. Транскрипција средњих и касних гена је контролисана везивањем специфичних вирусних протеина да би покренули секвенционирање у вирусном геному. С обзиром да су вируси из породице *Poxviridae* састављени од великог броја протеина, није изненађујуће да је стварање нових вириона комплексан процес. Формирање вириона укључује спајање ДНК унутар незрелих структура језгра облика полумесеца, који затим сазревају додавањем спољашњег омотача (Murphy и сар., 1999). Инфективни вириони без омотача се отпуштају ерупцијом из ћелије домаћина (Слика 5). Већина вириона са омотачем остаје закачена за површину ћелије домаћина и може ефикасно да се шири на суседне ћелије. Остали вириони са омотачем су слободни у екстраћелијском простору и одговорни су за дисеминацију вируса на удаљена места у организму домаћина (Maclachlan и Dubovi, 2010).

Слика 5. Грађа CaV - вирион без омотача и са омотачем (Viral zone, Swiss Institute of Bioinformatics).



преузето са: [https://viralzone.expasy.org/152?outline=all\\_by\\_species#tab6](https://viralzone.expasy.org/152?outline=all_by_species#tab6)

Величина генома LSDV износи око 151 kbp, а састоји се од централног кодирајућег региона ограниченог идентичним 2,4 kbp – инверзним терминалним понављањима и садржи 156 путативних гена односно отворених оквира читања (ORF-open reading frame). LSDV садржи већину гена *Poxviridae* укључених у базичне механизме репликације, укључујући и 26 гена који кодирају субјединице РНК полимеразе, иницијацију транскрипције иРНК, елонгацију и факторе терминације, као и ензиме који усмеравају посттранскрипциону обраду вирусне иРНК. Такође LSDV кодира најмање 30 хомологних протеина *Poxviridae* који су или структурни или укључени у морфогенезу и склапање вируса. LSDV садржи одређен број гена који одређују потенцијалну врсту домаћина, са могућим функцијама у модулацији или избегавању имунолошког одговора домаћина, у модулацији или инхибицији апоптозе ћелија домаћина, као и у аспектима ћелијског или ткивног тропизма. Ти гени су секвенцом и терминалном генском локацијом слични генима присутним код других вируса из породице *Poxviridae*. Шест хомологних протеина које кодира вирус LSD утичу на вируленцију вируса, раст вируса у специфичним типовима ћелија као и апоптозу ћелије, а три хомологна гена су везана за ћелијске ензиме. У централном региону генома, LSDV дели 65% колинеарности и идентичности на нивоу аминокиселина са генима других вируса сисара из породице *Poxviridae*, као што су *suipoxvirus*, *yatapoxvirus* и *leporipoxvirus*. У терминалном региону генома,

колинеарност је поремећена, и хомологи су или одсутни или деле око 43% идентичности на нивоу аминокиселина. Већина ових разлика се огледа у генима везаним за вируленцију вируса или опсег животињских врста домаћина. Сој вируса коришћен у овим истраживањима је Neethling тип сој 2490, 150.773 kbp, оригинално изолован у Кенији 1958 године, реизолован 1987. године из промена на кожи експериментално инфициране краве, а депонован у Банку гена под приступним бројем AF325528 (Tulman и сар., 2001).

Геном LSDV први пут изолованог у Србији је секвенциониран у дужини целог генома 2017. године. Изолат вируса LSD SERBIA/BUJANOVAC/2016 се састоји од 150.661 нуклеотида и 99,95% је идентичан на нивоу нуклеотида са Neethling Warmbaths LW (AF409137) сојем изолованим у Јужноафричкој Републици 1999. године, а 99,99% са Evros/GR/15 (KY829023) сојем. Депонован је у Банку гена под приступним бројем KY702007 (Toplak и сар., 2017).

### 2.2.3. Особине вируса

Вируси из породице *Poxviridae* се најчешће преносе приликом контакта вируса са оштећеном кожом, директно или индиректно преко контаминиране околине, механичким векторима, као што су инсекти. Углавном имају узак спектар домаћина. Ови вируси су отпорни у спољашњој средини, чак се сматрају једним од најотпорнијих вируса који изазивају обољења људи и животиња. На умереним температурама у осушеним крастама или простирци могу задржати инфективност дуго времена (Murphy и сар., 1999).

LSDV се може инактивисати на температури од 55°C у тајању од два сата или на 65°C у трајању од пола сата. Вирус из чворића на кожи чуваних на температури од -80°C може задржати инфективност 10 година, док чуван на температури од -4°C у медијуму за културу ћелија задржава инфективност 6 месеци. Осетљив је на екстремне вредности рН, док рН вредности у распону од 6,6 до 8,6 нису утицале на смањење титра вируса. Од хемијских и дезинфекционих средстава вирус LSD је осетљив на етар (20%), хлороформ, формалин (1%), натријум додецил сулфат, фенол (2% у трајању од 15 минута), натријум хипохлорит (2-3%), једињења јода (1:33), Виркон (2%) и кватернерна амонијумова једињења (0,5%) (EFSA, 2015; OIE, 2017a). У

табели 2 приказан је временски период одржавања LSDV у различитим узорцима материјала.

Табела 2. Временски период детекције LSDV у различитим врстама узорака методама молекуларне дијагностике или изолацијом вируса (EFSA, 2015).

Врста материјала	Временски период детекције вируса (број дана после инфекције)		Референца
	PCR	Изолација вируса	
	<b>Крв</b>	4-21	
<b>Пљувачка</b>	12-18	15-18	(Babiuk и сар., 2008a)
<b>Носни иседак</b>	12-21	12-18	(Babiuk и сар., 2008a)
<b>Чворићи на кожи</b>	92	39	(Tuppurainen, Venter and Coetzer, 2005)
<b>Семе</b>	159	42	(Irons, Tuppurainen и Venter, 2005)
<b>Кожа</b>	/	18	
<b>Простирка</b>	6 месеци уколико није изложена сунцу		

## 2.3. ЕПИЗООТИОЛОГИЈА

### 2.3.1. Морбидитет и морталитет

Морбидитет код инфекције изазване LSDV варира од 5% до 45%, док је морталитет углавном испод 10%. Код европских раса говеда морбидитет може достићи и 100% (Tuppurainen и сар., 2017). У ендемским подручјима морбидитет је углавном око 10%, док је морталитет низак и износи од 1% до 3% (Davies, 1991a; Babiuk, и сар., 2008a). Вредности морбидитета као и морталитета варирају у зависности од географског подручја и климатских услова, услова држања животиња, кондиције животиње и ухрањености, расе говеда, имунолошког статуса као и од распрострањености механичких вектора – инсеката (Al-Salihi, 2014). Током епизоотије у Израелу 2006. морбидитет је износио до 41,3%, док је током епизоотије у Оману на подручју Сохара и Низве морбидитет био од 26,3% до 29,7%, а морталитет



од 13,6% до 15,4% (Turpurainen и Oura, 2012; Tageldin и сар., 2014). На фарми Холштајн говеда у Оману 2009. године пријављен је морбидитет од 30-35%, а морталитет 12% (Kumar, 2011).

### 2.3.2. Пријемчиве врсте животиња - преживара

LSDV инфицира домаћа говеда (*Bos taurus* и *Bos indicus*) и азијског воденог бивола, док неки сојеви могу да се умножавају у овцама и козама (OIE, 2018; Turpurainen и сар., 2017). Говеда Холштајн Фризијске расе су осетљивија на инфекцију вирусом LSD од локалних зебу говеда (Gari и сар., 2011; Tageldin и сар., 2014), а међу најосетљивије расе говеда спадају Jersey и Guernsey (Davies, 1991a).

Позитиван налаз антитела против LSDV је утврђен код више дивљих преживара, као што су афрички биво, жирафа, белорепи и обичан гну, спрингбок и еланд антилопа, импала (Hedger и Hamblin, 1983; Barnard, 1997; Fagbo и сар., 2014). Ниво титра антитела утврђен код жирафе и антилопе (*Redunca arundinum*) одговарао је нивоу титра антитела говеда у ковалесценцији, што може да укаже на прележану инфекцију (Hedger и Hamblin, 1983). Међутим, улога дивљих преживара у епизоотиологији вируса LSD још увек није у потпуности разјашњена, као и где вирус опстаје за време минималне или недовољне активности вектора (Turpurainen и сар., 2017). Према Hedger и Hamblin 1983, дивље животиње не играју значајну улогу у епизоотиологији овог вируса. Код инфицираних животиња није описан стадијум носиоца вируса. Чак је и експериментално доказано да само 50% животиња ће развити клиничке симптоме болести, док све животиње постају виремичне (Turpurainen и сар., 2005; Annandale и сар., 2010). Сматра се да спорадични клинички случајеви LSD могу бити резултат перзистенције вируса на ниском нивоу у инпаратној или благој форми болести међу популацијом говеда у ендемским областима (Woods, 1988). До сада није утврђена разлика у вирулецији између сојева LSDV (EFSA, 2015).

### 2.3.3. Преношење

Тренутно је заступљен став да је главни пут преношења LSDV путем механичких вектора – инсеката који се хране крвљу. Врста вектора зависи од

популације инсеката који насељавају одређени регион где се болест јавља на шта највише утичу климатски фактори, годишње доба, температура, влажност и вегетација (Babiuk и сар., 2008а; Turpurainen и сар., 2017). LSDV је изолован из мува *Stomoxys calcitrans* и *Biomyia fasciata* након храњења на инфицираним говедима. Након вештачког храњења *Biomyia fasciata* са суспензијом LSDV, вирус је било могуће изоловати током три дана након храњења. Иако њихове улоге у преношењу вируса нису биле доказане, сматра се да ови инсекти могу да учествују у механичком преношењу вируса (Weiss, 1968). У истраживању спроведеном од стране Chihota и сар. 2003, LSDV је изолован из мува *Stomoxys calcitrans* непосредно након храњења на промењеним деловима коже вештачки инфицираног говечета, док је геном вируса PCR методом било могуће детектовати до 24h након храњења. Мувама је затим било дозвољено да се хране крвљу пријемчивих говеда, 1, 2 и 3 дана након храњења на вештачки инфицираном говечету. Сероконверзија није утврђена ни код једног од пријемчивих говеда. Сматра се да мува *Stomoxys calcitrans* може бити механички вектор али у кратак временски период од 1 до 12 сати после храњења, док је у овом истраживању механичко преношење покушано 24 сата касније (Chihota и сар., 2003). Такође женка комарца *Aedes aegypti* може да преноси LSDV у експерименталним условима са инфицираних на пријемчива говеда (Chihota и сар., 2001). Међутим, покушаји да се вирус пренесе комарцима *Anopheles stephensi*, комарцима *Culex quinquefasciatus*, шталском мувом *Stomoxys calcitrans* и мушицама *Culicoides nubeculosus* били су безуспешни (Chihota и сар., 2003). Постоје докази да и обади могу преносити LSDV, али је неопходно да се хране на промењеним деловима коже да би унели довољну количину вируса неопходну за преношење (Carn и Kitching, 1995b). С друге стране, могуће је преношење вируса механичким векторима који се хране крвљу са на изглед здраве коже виремичних животиња на животиње које до тада нису биле у контакту са вирусом. Новија истраживања су показала да и крпељи могу бити вектори LSDV. До сада је потврђено трансваријално преношење LSDV код *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, механичко и интрастадијално преношење код *Rhipicephalus appendiculatus*, као и транстадијално преношење код *Amblyomma hebraeum* (Lubinga и сар., 2013; Turpurainen и сар., 2013). Такође је доказано присуство вирусне ДНК у крпељима из родова *Rhipicephalus* и *Amblyomma* са високом стопом инфективности (33%-100%) (Turpurainen, 2015).



дана након инфекције, а експериментално је доказано да је преношење вируса инфицираним семеном могуће (Irons и сар., 2005; Annandale и сар., 2010).

Утицај глобалних климатских промена и сазнање да инсекти као вектори играју главну улогу у преношењу LSDV сугеришу да постоји основан ризик од даљег ширења и појаве LSD на другим новим географским подручјима (Turpurainen и сар., 2017). LSD нема зооноски потенцијал (OIE, 2016).

## 2.4. ПАТОГЕНЕЗА

Након инфекције говеда, LSDV се репликује у пријемчивим ћелијама домаћина на нивоу који још увек није детектабилан доступним молекуларним тестовима. Након експерименталне инфекције CaV-ом код оваца и коза имунохистохемијским бојењима уочено је присуство вируса у епителијалним ћелијама и макрофагима (Embury-Hyatt и сар., 2012). Код инфекције говеда LSDV имунохистохемијска бојења су показала присуство антигена вируса у кератиноцитима, епителу фоликула длаке, фибробластима, интерстицијалним макрофагима, инфилтрацијама у дермису, субкутису и паренхиму лимфних чворова. (Babiuk и сар., 2008b; Awadin и сар., 2011). Вирус се репликује унутар ћелија домаћина као што су макрофаги, фибробласти, перицити и ендотелне ћелије лимфних и крвних судова што доводи до васкулитиса и лимфаденитиса, док се тромбоза и инфаркти јављају у тешким случајевима инфекције. Након уласка вируса у организам домаћина, репликација се одвија у крви и ћелијама коже, а вiremија се може детектовати од 6. дана после инфекције. Током вiremије вирусне партикуле се шире крвотоком до пријемчивих органа. Вiremија траје у просеку око 9 дана, а најдуже око две недеље, када почиње стварање антитела која неутралишу вирус и заустављају даљу вiremију. Вирус се може наћи у носним, оралним и коњуиктивалним секретима најмање 7 дана по престанку вiremије (Babiuk и сар., 2008b; Al-Sahili 2014; Coetzer и Turpurainen, 2004). Такође је показано да говеда могу бити вiremична и у одсуству клиничке болести (Turpurainen и сар., 2005). Након вiremије долази и до стварања карактеристичних чворића на кожи, као и на пријемчивим ткивима, који се састоје од епителијаних ћелија. Та ткива могу бити мукозне мембране оралне шупљине, фаринкса, епиглотиса, румена, ретикулума, омазуса и абомазуса. Уз то, чворићи се могу јавити на мукозним мембранама носне

шупљине, трахеје и плућа. Што је клиничка слика болести тежа и озбиљнија, већи број унутрашњих органа биће захваћен. Кожа је најчешће захваћено ткиво у коме се одиграва репликација вируса, а такође и чворићи на кожи садрже највећу концентрацију вируса. Карактеристичне лезије на кожи су резултат умножавања вируса и ширења вирусних партикула на суседне ћелије. Постоји могућност да на изглед здрава кожа код животиња које су оболеле од тешке форме болести такође садржи LSDV (Davies, 1991a; Bowden и сар., 2008; Babiuk и сар., 2009). Присуство великих количина вируса у кожним променама уз присуство вируса у крви су веома значајни за механичко преношење вируса на инсекте векторе који се хране на инфидираним говедима (Bedeković и сар., 2017; Babiuk, 2018a). Животиње које преболе инфекцију LSDV ће у одређеном временском периоду неутралисати и елиминисати вирус из организма од вируса и неће бити клицоноше. Геном LSDV у кожним променама говеда је било могуће утврдити 42 дана после инфекције, док тачан временски период потребан организму да се неутралише вирус још увек није са сигурношћу утврђен (Babiuk и сар., 2008b; Babiuk, 2018a).

## 2.5. КЛИНИЧКА СЛИКА

Инкубациони период у теренским условима траје од 1 до 5 недеља, док после вештачке инфекције инкубациони период траје од 6 до 9 дана до појаве грознице (Cvetnić, 2005; OIE, 2016). Клиничка слика може да варира од инапаратне, благе, средње до тешке форме болести, а неки од фактора који утичу на то која ће се форма болести развити су доза унетог вируса, вирулентност вируса, генетска предиспозиција, имунолошки статус и старост домаћина (Babiuk, 2018b). Болест почиње појавом температуре од 40 °C до 41,5 °C која траје око седам дана, уз појаву лакримације, инапетенце, депресије и одбијање кретања. Долази до увећања суперфицијаних лимфних чворова, а код крава у лактацији до значајног пада млечности. Лезије на кожи у облику чворића се јављају, на глави, врату, вимену, скротуму, вулви и перинеуму између 7 и 19 дана након инокулације вируса, тј. 48 сати након појаве грознице. Чворићи су карактеристични, величине од 5 до 50 mm, округли, издигнути изнад нивоа коже, чврсти на додир и јасно ограничени (Слика 7). Може доћи до спајања већег броја чворића у ограничене плакове. Чворићи обухватају

све слојеве коже, епидермис, дермис и субкутис, а некад чак и мишиће. Број чворића на оболелој животињи варира од једног до преко хиљаду чворића. После неког времена чворићи некротизирају и доводе до стварања улцеративних лезија на кожи, које су веома пријемчиве за секундарне бактеријске инфекције. Након зарастања чворића, на кожи остају трајни ожиљци. Може се јавити и хромост, јер дубоки чворићи могу захватити тетиве и овојнице. Са појавом чворића на кожи, секрет из носа и очију може постати мукопурулентан. Лакримација може бити праћена појавом коњуктивитиса, што на крају може довести до замућења рожњаче и слепила. Обилна саливација и инапетенца доводе до губљења телесне масе. Улцеративне лезије се могу јавити на мукозним мембранама усне дупље, укључујући усне, гингиву, денталну плочу, језик, меко непце, фаринкс, епиглотис, као и на мукозним мембранама дигестивног тракта. Уз то, лезије се могу јавити и на мукозним мембранама носне дупље, трахеје и плућа. Појава лезија на плућима може довести до примарне или секундарне пнеумоније и озбиљних респираторних проблема. Гравидне краве могу побацили или отелити слабо виталну телад са променама у облику чворића на кожи и унутрашњим органима. Код оболелих бикова примећен је привремен или трајни стерилитет. Иако LSD ретко доводи до смртог исхода, кондиционо стање оболелих говеда је лоше и опоравак траје дуго након инфекције (Weiss, 1968; Babiuk и сар., 2008а; Al-Salihi, 2014; EFSA, 2015; OIE, 2016; Babiuk, 2018b).

Код експериментално инфицираних говеда отприлике једна трећина јединки не развије видљиве клиничке симптоме, међутим, све инфициране јединке постају виремичне. Појава субклиничких инфекција говеда је уобичајена и у природним условима (Turpurainen и сар., 2005).

Слика 7. Клиничка слика код оболелог говечета – (А,В) Карактеристични чворићи на кожи по којима је болест добила име - болест квргаве коже; (С) Лезија на носном огледалу (D) Лезија на вимену (Србија, 2016. године, слика је власништво: Научног института за ветеринарство “Нови Сад”).







## 2.6. ПАТОМОРФОЛОШКЕ И ПАТОХИСТОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ

Најуочљивије промене представљају промењени делови коже, односно чворићи по читавој површини тела. Неки чворићи су фиброзни, док су неки фиброзно-некротичног карактера. Може се уочити субкутани едем и повећање лимфних чворова, а на јетри и слезини се могу запазити некротична жаришта. Лимфни чворови су едематозни са присутном хиперплазијом лимфоидног ткива у фоликуларној и интерфоликуларној зони. Лезије на мукозним мембранама респираторног и дигестивног тракта се јављају у виду ерозија и улцерација. Уочена је хиперплазија и хиперсекреција мукозних мембрана усне дупље и горњег респираторног тракта. Чворићи су на попречном пресеку сиво-беле боје, могу садржати ексудат, а централни део старијих чворића је сачињен од секвестара некротичног материјала.

Акутне хистолошке лезије се састоје од епидермалних вакуоларних промена са интрацитоплазматским инклузионим телашцима и дермалног васкулитиса. Инклузиона телашца су бројна, еозинофилног карактера, хомогене до грануларне структуре, а јављају се у епителијалним ћелијама, фибробластима, макрофагима, перицитима и кератиноцитима. Најистакнутије промене укључују васкулитис са фибриноидном некрозом, едем, тромбозу, лимфангитис, одвајање епидермиса од дермиса, као и мешовите инфламаторне инфилтрате. У дубљим деловима епидермиса, близу базалног слоја види се блага лимфоцитна инфилтрација. У кожним папилама види се жаришна и дифузна инфилтрација моноклеарним ћелијама, као и едем и дегенерација колагених нити. Могу се уочити конгестије и крварења у поткожју, инфилтрација моноклеарним ћелијама, а мишићни фибрили могу бити некротични. Хроничне промене карактерише инфарктно ткиво са секвестрима некротичног материјала у централном делу, често окружено гранулационим ткивом које постепено замењује фиброзно ткиво (Cvetnić, 2005; Prozesky и Barnard, 1982; OIE, 2016).

## 2.7. ИМУНИТЕТ

Постоји неколико фактора који одређују степен пријемчивости животиње на инфекцију изазвану LSDV, као што су вируленција вируса, имунолошки статус, старост и раса домаћина. Интеракција између имунолошког система домаћина и вируленце вируса одређује исход болести (Babiuk, 2018c). Код говеда може да се јави природна отпорност на инфекцију вирусом LSD, која није повезана са имунитетом (Weiss, 1968). Вируси унутар рода CaV су 95% идентични на нивоу нуклеотида и имају заједнички главни антиген за неутрализациона антитета, па животиње које се опораве од природне инфекције су отпорне на реинфекцију (Kitching, 1986a; Davies, 199b; Tulman и сар., 2002; Babiuk и сар., 2009b; EFSA, 2015). Имунолошким анализом је демонстрирано да 32kd главни протеин омотача поседује неутрализационе и Т-ћелијске епитопе и да учествује у имунолошком одговору на CaV инфекције код све три пријемчиве врсте: говеда, оваца и коза (Chand, 1992). Истраживања вршена на ову тему су открила да је унакрсни имунитет стечен вакцинацијом нехомологим вакцинама против вируса из овог рода само делимичан. Од 437 говеда вакцинисаних вакцином против вируса овчијих богиња (Kenyan сој) у Етиопији, 104 говеда је оболело од LSD, док је 11 случајева болести завршено смртним исходом (Ayelet и сар., 2013). У Израелу је након вакцинације говеда такође са вакцином против SPV (RM65 сој) дошло до клиничке манифестације болести у виду карактеристичних промена на кожи (Brenner и сар., 2009); Tageldin и сар., 2014). Познато је да након експерименталне инфекције говеда са LSDV, само 40-50% животиња развије клиничке знаке болести, односно генерализоване кожне промене. Трећина експериментално инфицираних бикова је развила тешку, генерализовану форму болести, трећина бикова је показивала знаке фебрилности праћене појавом малог броја промена на кожи, док је трећина бикова имала само пролазну грозницу (Turpurainen, и сар. 2005; Osuagwu и сар., 2007; Annandale и сар., 2010).

Врста најефикаснијег имунолошког одговора који ће зауставити ширење инфекције и појаву клиничких знакова болести зависи од места репликације вируса (Mikhael и сар., 2017). Сматра се да је имунитет против вируса из рода CaV ћелијски посредован, али је и улога хуморалног имунитета такође значајна у одбрани организма од ових вируса (Woods, 1988; Carn, 1993; Seet и сар., 2003). Антитета су ефикасна против вируса који се налазе екстрацелуларно, док је ћелијски посредован

имунитет важнији за вирусе који се репликују интрацелуларно (Mikhael и сар., 2017). Сматра се да вирус који се интензивно умножава у организму домаћина изазива јачи имунолошки одговор у односу на вирус који се не умножава (Turraigainen и сар., 2017). Већина вирусних потомака остаје унутар инфициране ћелије са изузетком екстрацелуларних вириона са омотачем који се ослобађају пупљењем из инфициране ћелије. Ови екстрацелуларни вируси могу инфицирати суседне ћелије или доспети у крвоток и тако се ширити по организму. Вируси који се шире локално, из ћелије у ћелију су ван домаћаја циркулишућих антитела. Циркулишућа антитела могу да спрече ширење вируса који се налазе екстрацелуларно, али не могу да утичу на репликацију вируса који се налазе интрацелуларно на месту уласка вируса у организам (Cam, 1993; EFSA, 2015). Антитела у крвном серуму је могуће детектовати два дана након појаве клиничких симптома болести, а антитела перзистирају неколико месеци. Антитела се обично јављају око 15 дана после вакцинације, а достижу највиши ниво око 30 дана након вакцинације. После 30. дана ниво антитела се смањује испод нивоа детекције. Животиње са слабо израженим клиничким симптомима или вакцинисане животиње често развијају низак ниво неутрализационих антитела који се не може детектовати доступним серолошким тестовима, али то не значи да нису заштићене ћелијским имунолошким одговором (Weiss, 1968; OIE, 2016; Turraigainen и сар., 2017). Такође је показано да код инфекција CaV благе инфекције доводе до стварања знатно нижег нивоа антитела у односу на клинички знатно изражене инфекције (Bowden и сар., 2009). У неколико истраживања је експериментално доказано да пасиван трансфер серума животиње инфициране вирусима из породице *Poxviridae* може да заштити животињу примаоца од инфекције након излагања вирулентном соју вируса. Тако је доказана улога антитела у одбрани организма од болести изазваних вирусима из породице *Poxviridae* (Kitching, 1986b; Edghill-Smith и сар., 2005). Телад рођена од вакцинисаних крава наслеђују пасивни имунитет, који презистира око шест месеци (Weiss, 1968). С обзиром да антитела након вакцинације крава вакцином против LSDV могу бити присутна у серуму испод нивоа детекције расположивим тестовима, тешко је пратити пасивни трансфер антитела из колострума ако антитела нису присутна у серуму вакцинисаних крава (Babiuk, 2018c)

Улога ћелијског имунитета код инфекције изазване вирусом болести квргаве коже још увек није у потпуности испитана, али је улога ћелијски посредованог имунитета описана код других болести изазваних из породице *Poxviridae* (Babiuk,

2018c). У експерименталним истраживањима на нокаут мишевима инфицираним *Ectromelia* вирусом, показана је улога INF- $\gamma$  и перфоруина, као и В ћелија и молекула МНС (major histocompatibility complex) класе II. Недостатак перфоруина и INF- $\gamma$  довео је до потпуног прекида одговора цитотоксичних Т лимфоцита, док је недостатак CD4 Т ћелија довео до смањења јачине одговора за око три пута. Истраживање је показало да антитела играју значајну улогу у контроли вируса и потпуном опоравку од инфекције изазване *Ectromelia* вирусом. Мишеви дефицитарни у функционалним CD8 Т ћелијама су угињавали раније због превелике количине вируса у организму, док су мишеви дефицитарни у В ћелијама или антителима могли да контролишу репликацију вируса у раним фазама инфекције, да би касније и они подлегли болести (Chaudhri и сар., 2006). Додатна истраживања на мишевима инфицираним *Ectromelia* вирусом су показала да су антитела неопходна за опоравак организма од секундарне инфекције изазване вирусом из породице *Poxviridae*, за разлику од CD4+ и CD8+ Т ћелија. Мишеви са недостатком В ћелија, молекула МНС класе II и CD 40, прво изложени авирулетном соју вируса, а затим вирулентном соју, су подлегли секундарној инфекцији (Panchanathan и сар., 2006). Такође је на моделу нокаут мишева инфицираних *Ectromelia* вирусом демонстрирана и улога NK (Natural Killer) ћелија, где је показано да недостатак NK ћелија повећава осетљивост резистентних мишева на инфекцију (Parker и сар., 2007). Слична истраживања ради утврђивања улога ових ћелија током инфекције LSDV нису вршена на говедима као експерименталним моделима. Приликом имунолошког одговора организма на инфекцију LSDV битни су и хуморални и ћелијски посредовани имунитет. Улога хуморалног имунитета је потврђена приликом пасивног трансфера антитела, а улога ћелијски посредованог имунитета код вакцинисаних животиња у одсуству детектабилног нивоа антитела. Највероватније је да су и хуморални и ћелијски посредован имунолошки одговор неопходни за стварање заштитног имунитета против инфекције изазване CaV-ом (Seet и сар., 2003). Код експеримента са пасивним трансфером серума инфициране јединке, ћелијска компонента имуног система је и даље присутна и стимулирана од стране вируса да ствара имунолошки одговор, исто тако код вакцинисаних јединки је вероватно да В ћелије стварају одговоре антитела, који су испод прага детекције доступним тестовима (Babiuk, 2018c).

Врло је вероватно да имунитет изазван CaV-ним инфекцијама доживотан код инфицираних животиња код којих се развила клиничка слика болести. За разлику од тога, код инфицираних животиња које нису развиле клиничку слику болести или код

вакцинисаних животиња, имунитет највероватније не траје доживотно (Babiuk, 2018c). Говеда вакцинисана рекомбинантном вакцином KS-1 против куге малих преживара и LSD, изложена вирулентном соју LSDV две године након вакцинације су и даље била у потпуности заштићена, док је заштита три године након вакцинације била само делимична (Ngichabe и сар., 2002). Код природно инфицираних животиња присуство антитела против CaV-а се може обично утврдити 3 до 6 месеци после инфекције (Turpurainen и сар., 2017). Имунолошки статус вакцинисане или инфициране животиње није сразмеран нивоу неутрализационих антитела у серуму (Weiss, 1968; Kitching, 1986a).

P32 антиген је структурни протеин (ORF 074) присутан у свим сојевима CaV и садржи главну антигену детерминанту, а представља Н3L хомолог вакцинија вируса који је главни имунодоминантни антиген локализован у површинском омотачу интрацелуларног комплетног вириона (Chand, 1992; Zinoviev и сар., 1994; Tulman и сар., 2002). P32 протеин се користи у серолошкој дијагностици као таргет протеин за детекцију антитела, с тим што је сојеве унутар рода CaV серолошким методама немогуће разликовати (Kitching и сар., 1987; OIE, 2018; OIE, 2017b). Антигени CaV-а одговорни за стварање неутрализационих антитела за сада нису познати. Вероватно је да постоји неколико антигена који доводе до стварања заштитног имунитета против CaV-а, а такође постоји могућност да су ти антигени исти за вирусе унутар рода CaV с обзиром на њихове сличности. Одређивање који су заштитни антигени захтева “challenge” експерименте код пријемчивих врста као што су овце, козе и говеда. Такође још увек нису познати ни заштитни антигени укључени у Т-ћелијском имунитету (Babiuk, 2018c).

## **2.8. ДИЈАГНОСТИЧКЕ МЕТОДЕ БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ**

Специфична дијагноза инфекција изазваних вирусима из породице *Poxviridae* се може поставити на један од три начина: изолацијом и идентификацијом инфективног агенса, директним утврђивањем присуства вириона, вирусних антигена или вирусне нуклеинске киселине у узорцима ткива и детекцијом присуства и количине антитела у серуму или телесним течностима (Pfeffer и Meyer, 2007). Дуги низ година је електронска микроскопија била један од главних начина

идентификације партикула вируса из породице *Poxviridae*. Међутим сличности у морфологији вируса из породице *Poxviridae*, отежава идентификацију одређеног рода или врсте унутар рода. Такође родови унутар породице *Poxviridae* су антигенски веома слични па их је тешко разликовати и серолошким тестовима. Као метода избора наводи се ланчана реакција полимеразе – PCR (polymerase chain reaction), која омогућава брзу, поуздану и прецизну идентификацију вирусног генома. Сем дијагностике, секвенционирање генома вируса омогућава поређење са доступним подацима и тако детаљнија молекуларна епидемиолошка и еволуциона истраживања (Pfeffer и Meyer, 2007).

### 2.8.1. Изолација вируса

Присуство вирусних партикула у узорцима ткива се може доказати помоћу електронског микроскопа, међутим због идентичне величине вирусних партикула унутар рода CaV не може се идентификовати специфична врста (Kitching и Smale, 1986). Такође се електронском микроскопијом не могу разликовати вируси из рода CaV и *Orthopoxvirus* (MacLachlan и Dubovi, 2010; OIE, 2016). LSDV изазива стварање карактеристичног цитопатогеног ефекта (ЦПЕ) и интрацитоплазматских еозинофилних иклузионих телашца (Diallo и Viljoen, 2007; Babiuk и сар., 2008a). Интрацитоплазматска телашца су неправилног облика и може се јавити једно или више унутар једне ћелије (Weiss, 1968).

Изолацију вируса је најбоље радити из узорака промењене коже (чворића), јер садрже високе концентрације вируса. Уз то је могуће користити узорке оралних и назалних брисева (Bowden и сар., 2008). Узорке за изолацију вируса било би добро узети у току од недељу дана након појаве симптома болести, пре појаве неутрализационих антитела (Davies и сар., 1971). Међутим, из чворића на кожи је могуће изоловати вирус и 3-4 недеље након инфекције. Мана ове методе је што дуго траје, потребно је до 10 дана да би се уочио карактеристичан ЦПЕ, а некад је потребно више пасаж да би се изоловао вириус (Babiuk, 2018d). Изолација CaV се може потврдити имунобојењем уз коришћење анти-CaV серума (Babiuk и сар., 2007; Gulbahar и сар., 2007). Није могуће разликовати SPV и GPV и LSDV користећи културу ћелија јер је ЦПЕ ових вируса идентичан, а не постоје серотипови унутар рода да би спречили реакцију са специфичним антителима (Kitching, 1986b). CaV

расту на разним културама ћелија овчијег, козјег и говеђег порекла. Вируси рода CaV се споро умножавају на култури ћелија и захтевају неколико пасажа. Доводе до стварања распознатљивог ЦПЕ, са појавом карактеристичних плакова које карактерише стварање издужених ћелија (Weiss, 1968; EFSA, 2015). Тренутно примарне и секундарне културе ћелија јагњећег тестиса, јагњећег бубрега и говеђих ћелија дермиса се најчешће користе за изолацију вируса (Babiuk и сар., 2007; Kalra и Sharma, 1981; OIE, 2016). (Babiuk и сар., 2008b). У многим истраживањима коришћене су континуиране културе ћелија за изолацију LSDV, пре свега MDBK (Madin Darby bovine kidney – култура ћелија говеђег бубрега). На MDBK култури ћелија LSDV такође доводи до стварања ЦПЕ који карактеришу заобљавање ћелија, агрегација ћелија и формирање кластера у року од 72 сата (El-Nahas и сар., 2011; Ateya и сар., 2017; Toplak и сар., 2017; Lojkić и сар., 2018; Salnikov и сар., 2018). Vero (African green monkey kidney) ћелије и хориоалантоиска мембрана емрионираних кокошијих јаја се такође могу користити, али се не препоручују за примарну изолацију LSDV (OIE, 2016).

### **2.8.2. Молекуларне методе дијагностике - PCR и *real time* PCR**

PCR метода се заснива на принципима природне репликације ДНК а крајњи производ представља стварање великог броја копија циљне ДНК секвенце из комплексног микса хетерогених секвенци. PCR методом може да се умножи циљни регион од 50 до неколико хиљада базних парова у милијарду копија. Умножавање ДНК се постиже током серије циклуса на различитим температурама. Обично је потребно 30 до 40 циклуса да би се умножила циљна ДНК секвенца. Циљни део ДНК молекула који се жели умножити одређује се кратким ологонуклеотидима – прајмерима, који га ограничавају. Ови прајмери су покретачи серије реакција помоћу ензима ДНК полимеразе, која на капсулу једног ланца ДНК синтетише нови, комплементарни ланац, при чему величина новог синтетисаног дела ДНК молекула одговара дужини коју ограничавају изабрани прајмери. PCR методом се не може разликовати присуство живих вируса од присуства њиховог генетског материјала, што треба имати у виду приликом тумачења резултата (Pfeffer и Meyer, 2007).

Молекуларне методе дијагностике као што су PCR и *real time* PCR представљају једноставне, брзе и осетљиве тестове за детекцију вирусног антигена LSD у пуној

крви, семену, узорцима ткива или културе ћелија. Погодне су за коришћење у земљама у којима LSD није ендемична и у којима дијагностичке методе засноване на коришћењу живог вируса нису доступне (Heine и сар., 1999). У скорије време, су описане квантитативне *real time* PCR методе, које су још брже, осетљивије и специфичније од конвенционалних PCR метода (Balinsky и сар., 2008; Bowden и сар., 2008). Описан је и *real time* PCR метод помоћу којег је могуће разликовати SPV, GPV и LSDV (Lamien и сар., 2011a). Овај врсно-специфични *real time* PCR тест детектује разлике у температури топљења за SPV и GPV и LSDV, добијених након флуоресцентне анализе криве топљења. Он погађа 200 bp регион унутар GPCR гена одговорног за опсег домаћина. Значај коришћења овог метода огледао би се у одабиру адекватне вакцине у земљама где су све болести из рода CaV присутне. Овај метод је још увек релативно скуп за лабораторије са ограниченим средствима и захтева обучено особље (EFSA, 2015). Предности *real time* PCR у односу на конвенционални PCR је његова брзина, могућност квантификације испитиваног материјала и могућност укључивања контрола за детекцију инхибитора реакције. Упркос овим предностима, PCR резултате би требало потврдити са бар још једним додатним тестом (Babiuk и сар., 2008a).

У недостатку *real time* PCR, конвенционални PCR представља методу избора, јер је јефтинији, није толико подложен техничким проблемима, али с друге стране није квантитативан. Међутим, осетљивост и специфичност овог метода су далеко изнад других доступних метода за детекцију антигена. Развијен је и PCR тест којим је могуће разликовати SPV и GPV (Lamien и сар., 2011b), као и новији метод заснован на *snapback* прајмерима (Gelaye и сар., 2013). Могуће је развити јединствени PCR тест којим би се могли идентификовати сви CaV изолати, уз могућност дораде ради идентификације вакциналних изолата (Orlova и сар., 2006).

Узорци за детекцију генома конвенционалним PCR или *real time* PCR могу бити узети и у присуству неутрализационих антитела. Након појаве првих симптома болести, вирусну нуклеинску киселину у чворићима на кожи је могуће доказати PCR методом до три месеца (Turpurainen и сар., 2005).

Vidanović D. и сар. 2016, су развили *real time* PCR методе (KV-2 и FLI) за специфичну детекцију теренских балканских сојева LSDV. Као најважнија мера контроле LSD наводи се вакцинација говеда атенуираном вакцином, која у неким случајевима може довести до благих поствакциналних реакција, сличних симптомима LSD. У тим случајевима веома је битно имати доступне брзе и специфичне



дијагностичке методе које омогућавају разликовање теренских од вакциналних сојева LSDV (Vidanović и сар., 2016).

### 2.8.3. Серолошке методе дијагностике

Серолошке методе се у дијагностици LSDV углавном користе за доказивање специфичних антитела насталих током одбрамбене реакције имунолошког система на присуство вируса у организму инфициране животиње. Сви вируси из рода CaV (SPV, GPV и LSDV) деле заједнички главни антиген за неутрализациона антитела тако да их искључивом применом серолошких метода није могуће разликовати (Davies и Otema 1981; Kitching, 2003; Ayelet и сар., 2013; OIE, 2016). Серолошки тестови су погодни за ретроспективна серолошка истраживања на нивоу запата, али нису довољно осетљиви да би се користили као примарни тестови за појединачно испитивање оболелих грла (EFSA, 2015). Од серолошких метода користе се агар гел имунодифузија (АГИД), индиректна имуофлуоресценција, Western blot и вирус неутрализациони тест, са више или мање успеха у детекцији антитела. АГИД даје укрштenu реакцију са антителима против вируса из рода *Parapoxvirus*, ВНТ је захтеван за извођење и захтева употребу живог вируса, што представља ограничење за употребу у земљама слободним од болести квргаве коже, а Western blot је скуп и не користи се у рутинској дијагностици (Bowden и сар., 2009). Уз горе поменуте методе, развијени су и ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) тестови за детекцију антитела против вируса рода CaV. EFSA наводи да се осетљивост ELISA тестова за детекцију антитела против вируса богиња оваца и коза креће у распону од 70% до 100%, док специфичност износи од 84% до 100%. Осетљивост ВНТ се креће у распону од 70% до 96%, док специфичност достиже 100% (EFSA, 2015).

Вирус неутрализациони тест (ВНТ) се сматра златним стандардом серолошке дијагностике CaV-а, веома је специфичан, али није довољно осетљив да детектује ниске нивое антитела код неких животиња након опоравка од природне инфекције или након вакцинације (Kitching и сар., 1987; EFSA, 2015). Недостатак ВНТ је што траје неколико дана, захтеван је за извођење и захтева коришћење обученог особља и живог вируса, чија употреба често није дозвољена у земљама слободним од LSD (Babiuk и сар., 2008a). ВНТ још увек није довољно осетљив за одређивање имунолошког статуса циљне популације говеда (Turpurainen и Oura, 2012).

Осетљивост ВНТ се креће од 70% до 96%, а специфичност и до 100% (Sadri и сар., 2002; Gari и сар., 2008; Babiuk и сар., 2009a). Неутрализациона антитела се почињу стварати 3-4 дана након појаве клиничких симптома болести, а највиши ниво достижу за 2-3 недеље. С обзиром да је имунитет против вируса из рода CaV претежно ћелијски посредован, антитела се у циркулацији могу детектовати у периоду од седам до осам месеци (OIE, 2016). Употреба рекомбинантног CaVa са експресијом EGFP (enhanced green fluorescent protein) гена смањује се потребно време за детекцију вирус неутрализационе активности са 6 на 2 дана (Wallace и сар., 2007; Babiuk и сар., 2008a). Према протоколу OIE, извођење ВНТ се врши уз коришћење CaV (вакцинални сој), инактивисаних испитујућих серума у разређењу од 1:5 до 1:5000, на Vero или LT култури ћелија. Инкубација се врши на 37°C у периоду од 9 дана, уз свакодневно контролисање плоча на појаву ЦПЕ, почев од 4. дана. Испитујући серум може да се титрира уз константан титар вируса (100 TCID<sub>50</sub> – 50% tissue culture infective dose), или стандардни сој вируса може да се титрира уз константно разређење серума ради израчунавања неутрализационог индекса (OIE, 2016). Због различите осетљивости културе ћелија на CaV, као и потешкоћа да се осигура коришћење константне инфективне дозе вируса, препоручује се метода неутрализационог индекса, иако захтева употребу веће количине испитујућег серума. Неутрализациони индекс представља разлику log титра између титра вируса у негативном серуму и у испитујећем серуму. Индекс од  $\geq 1,5$  се сматра позитивним. Тест се изводи у микротитар плочама равног дна са 96 базенчића (Pfeffer и Meyer, 2007; OIE 2018; OIE 2017b).

Имуноензимски ELISA тестови су серолошки тестови избора за квалитативно и квантитативно одређивање антитела. Имају широку употребу у епидемиолошким испитивањима и програмима мониторинга за ендемске и егзотичне болести (Pfeffer и Meyer, 2007). До сада је описано неколико ELISA техника за детекцију антитела, међутим према дијагностичком протоколу OIE, ниједна ELISA техника још увек није нашла препоруку за ширу употребу. Сви серолошки тестови тог типа наилазе на исти проблем, да различити површински протеини интрацелуларних вириона без омотача и интрацелуларних и екстрацелуларних вириона са омотачем доводе до стварања различитих антитела у организму домаћина, и да њихови релативни односи могу варирати током различитих фаза инфекције (Turraigainen и Ouga, 2012). Развијени су ELISA тестови засновани на протеину р32 омотача вируса за детекцију антитела код говеда, али су експресија и стабилност рекомбинантног антигена представљали

проблем за комерцијалнију употребу (Carn и сар., 1994; Bowden и сар., 2009). Испитивање узорака серума експериментално ифицираних говеда, показало је да је ELISA осетљивија од ВНТ, и да детектује постинфективна антитела против СаV раније од ВНТ (Carn *et al.*, 1994). Развијена је и ELISA метода за детекцију антитела против SPV и GPV и LSDV, која користи пречишћени вирус богиња оваца као антиген. Испитивањем 276 серума говеда, показана је дијагностичка осетљивост од 88%, а специфичност од 97% (Babiuk и сар., 2009a). Нажалост, због потешкоћа у производњи довољне количине инактивисаног антигена, ни овај тест није наишао на ширу употребу. Такође је представљена и ELISA која је заснована на рекомбинантним протеинима (095 и 103) вируса богиња оваца и тестирањем 300 говеђих серума из Аустралије је утврђено да дијагностичка специфичност овог теста износи 95% (Bowden и сар., 2009).

Индиректни флуоресцентни тест, у којем се користи антиген СаV-а фиксирани у култури ткива се може користити за детекцију антитела против LSDV из узорака серума. Тест је показао задовољавајућу осетљивост, али укрштена реактивност са *Parapoxvirusom* и *Orthopoxvirusom* може утицати на специфичност теста при већим разређењима серума (Gari, 2011b). У истраживању спроведеном у Етиопији, индиректни флуоресцентни тест је приказан као погодан за ретроспективна серолошка истраживања сееролошки надзор циљне популације говеда. У поређењу са ELISA тестом, скупљи је, извођење теста дуже траје и обухвата мањи број узорака (45 узорака по плочи) (Gari и сар., 2008).

Поред додатних испитивања осетљивости и специфичности већ постојећих метода, неопходно је радити на унапређењу постојећих и развоју бржих и ефикаснијих метода за детекцију антитела против LSDV.

## **2.9. ЕКОНОМСКИ АСПЕКТИ И КОНТРОЛА БОЛЕСТИ**

Болест квргаве коже се налази на ОИЕ листи заразних болести које се обавезно пријављују због брзог ширења и значајног економског утицаја на говедарство. Говеда на врху лактације су посебно осетљива на LSD, што уз појаву секундарних маститиса и грознице доводи до знатног пада млечности. Такође, могу се јавити и побачаји и

привремени стерилитет код оболелих говеда. Оболела говеда мршаве, а и чак након прележале инфекције период опоравка је дуг и знатно утиче на смањење прираста код месних раса говеда (Weiss, 1968). Промене на кожи могу оставити трајне ожиљке и тиме умањити вредност и употребљивост коже у кожарској индустрији (Green, 1959). Високо продуктивне расе говеда као Холштајн-Фризијска и Церсеј су више пријемчиве на LSD од афричких и азијских раса говеда (Davies, 1991). На високо интензивним фармама млечних говеда на Блиском Истоку, процењени губици изазвани појавом LSD су износили од 45% до 65% (Kumar, 2011). Утицај појаве LSD у Етиопији на губитак у производњи и трошкове контроле болести је такође висок. Губици су се углавном огледали у морбидитету и морталитету, и били су највећи код високо продуктивних говеда, са морталитетом као најзначајнијим узроком губитака, затим је следио пад у производњи млека (Molla и сар., 2017). Индиректни финансијски губици изазвани појавом LSD се огледају у забрани кретања и трговине стоком, као и у скупим кампањама вакцинације (Turpurainen и сар., 2017). На глобалном нивоу гледано, у земљама у којима је LSD још увек егзотична, економски торшкови због предузетих мера ерадикације болести и забране трговине стоком били би знатни и упоредиви са трошковима које су изазвале епизоотије болести слинавке и шапа (Garner и Lack, 1995; De Clercq и Goris, 2004; Babiuk и сар., 2008a).

Вакцинација говеда против вируса болести квргаве коже се показала као најефикаснија мера спречавања ширења болести у зараженим и ендемичним подручјима. У случају појаве LSD у земљама претходно слободним од те болести принудно клање инфицираних говеда и говеда у контакту са инфицираним говедима, као и забрана кретања животиња представљају ефикасне мере контроле, под условима да се болест на време открије, а мере предузму без одлагања. Уколико појава болести протекне неопажено, и дође до инфицирања инсеката вектора, веома је тешко, скоро и немогуће сузбити болест без вакцинације. У земљама у којим са економског аспекта није оправдано клање инфицираних и говеда која су била у контакту са инфицираним говедима, јер представљају значајан извор хране, а с друге стране забрану кретања преживара је скоро немогуће спровести, вакцинација је једини начин контроле болести (EFSA, 2015). Тренутно је доступна само жива, атенуирана вакцина против болести квргаве коже (*Nethleeng* сој). Могуће је користити и вакцину против богиња оваца и коза за вакцинацију говеда, али унакрсна заштита није одговарајућа и ова вакцина је ограничена само за употребу у земљама у којима се богиње оваца и коза ендемски јављају (Khalafalla и сар., 1993; Ayelet и сар., 2013; EFSA, 2015). Постоје

одређене рестрикције за употребу живе вакцине у земљама слободним од болести квржаве коже због потенцијалног ширења вакциналног соја вируса (Abutarbush и сар., 2016; Bedeković и сар., 2018; Katsoulos и сар., 2018). Локална реакција на кожи на месту инокулације у облику гранулома, као и грозница и смањење производње млека су неки од симптома који могу да се јаве након вакцинације говеда са живим, атенуираним вакцинама које садрже CaV. Појава нежељених реакција на вакцинацију против LSDV, као што су пад млечности или локалне до генерализоване промене на кожи у виду чворића су довеле до тога да су многи власници стоке одбијали вакцинацију говеда, осим у случајевим директне претње од појаве болести (EFSA, 2015; Abutarbush и сар., 2016; Bedeković и сар., 2018; Katsoulos и сар., 2018). Трајање имунитета након вакцинације против вируса болести квржаве коже није у потпуности разјашњено. Неутрализациона антитела постају детектибилна од десетог дана после вакцинације, а највиши ниво достижу око тридесетог дана после вакцинације и перзистирају одређени временски период. Не развијају све вакцинисане животиње детектабилан ниво антитела након вакцинације, али то не значи да нису заштићене (Turpurainen и сар., 2017). Телад рођена од вакцинисаних крава наслеђују пасивни имунитет, који презистира око шест месеци (Weiss, 1968). С обзиром на изостанак конзистентних серолошких резултата, поствакцинални мониторинг заснован искључиво на серолошким методама је за сада слаб показатељ ефикасности вакцинације. Уколико се вакцинација спроводи редовно, односно једанпут годишње, а имунитет на нивоу крда одржава преко 80% постиже се задовољавајућа заштита (Turpurainen и сар., 2017). На пример, епизоотије LSD у Израелу 2012-2013. године и на северном делу Кипра 2014-2015. године су успешно стављене под контролу захваљујући спроведеној масовној вакцинацији говеда вакцином против LSD (Ben-Ger и сар., 2015; Turpurainen и сар., 2017). Анализом података о ефикасности вакцине против вируса LSD (Neethling сој) током епидемије на Балканском полуострву, израчунато је да је просечна ефикасност вакцине износила 79,8% у шест земаља (Бугарска, Грчка, Србија, Црна Гора, Северна Македонија и Албанија), са најнижом ефикасношћу у Албанији од 62,5%, а највишом од 97% у Бугарској и Србији. Анализом је такође утврђено да је од момента вакцинације до стварања заштитног имунитета било потребно време од 14 дана. Уочен је и већи ризик од инфекције на фармама на којима се говеда држе на паши у односу на фарме затвореног типа, због присуства вектора (Klement и сар., 2018).

Ради спровођења ефикасних мера контроле против болести квргаве коже, као што су вакцинација и серолошки надзор запата, неопходно је извршити даља истраживања везана за поствакцинални имунолошки одговор, како код одраслих јединки, тако и код телади.

### 3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви ове докторске дисертације су:

- Омогућити бржу и ефикаснију серолошку дијагностику болести квргаве коже употребом модификованог вирус неутрализационог теста у трајању од 3 дана.
- Праћење антитела против вируса болести квргаве коже код вакцинисаних крава, ради сагледавања динамике развоја антитела и поствакциналног статуса.
- Утврђивање присуства антитела против болести крвгаве коже у колоструму вакцинисаних крава и у крви телади, ради бољег разумевања трансфера хуморалног матерналног имунитета код телади.
- Праћење перзистенције матерналних антитела код телади, пореклом од вакцинисаних крава, ради могућности одређивања благовремене вакцинације телади.
- Спровођење поступка валидације и потврде примене модификованог вирус неутрализационог теста развијеног на Одељењу за вирусологију Научног института за ветеринарство „Нови Сад“ упоредним испитивањима истих узорака модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом.

Наведени циљеви истраживања су остварени кроз следеће задатке:

- Разраду извођења поступка модификованог вирус неутрализационог теста развијеног у Одељењу за вирусологију Научног института за ветеринарство „Нови Сад“ што укључује:
  - Умножавање изолованог вируса болести квргаве коже од оболелог говечета на почетку појаве епидемије болести у Републици Србији и утврђивање титра умноженог вируса болести квргаве коже у трајању од 3 дана коришћењем MDBK културе ћелија.
- Утврђивање антитела против вируса болести квргаве коже код крава пре појаве болести у Републици Србији модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом.

- Утврђивање и праћење присуства антитела против вируса болести крвгаве коже код вакцинисаних говеда, модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом.
- Утврђивање и праћење присуства матерналних антитела против вируса болести крвгаве коже код телади, пореколом од вакцинисаних крава, модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом.
- Утврђивање присуства антитела против вируса болести крвгаве коже у колоструму вакцинисаних крава, модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом.
- Упоредивање резултата испитивања добијених модификованим вирус неутрализационим тестом и комерцијалним ELISA китом коришћењем *карпа* теста.
- Утврђивање специфичности и осетљивости модификованог вирус неутрализационог теста и комерцијалног ELISA кита у детекцији антитела против вируса болести крвгаве коже.

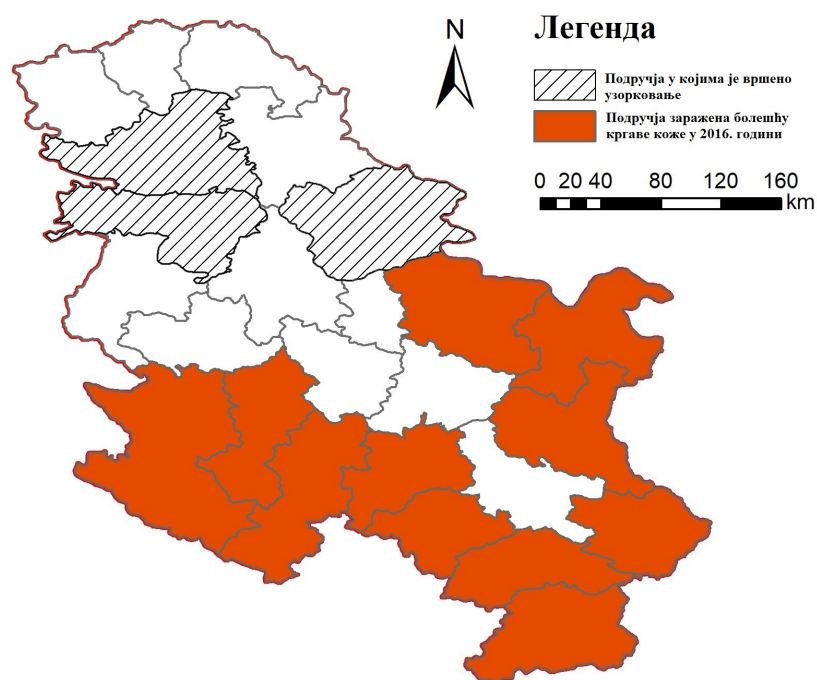


## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. МАТЕРИЈАЛ

Узорци за испитивање коришћени у овом истраживању потичу од говеда са епизоотиолошких подручја за које су надлежани Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“ (НИВ-НС) и Ветеринарски специјалистички институт „Панчево“. У овим подручјима није регистрована болест током епизоотије у Србији 2016. године, а вакцинација говеда против болести квржаве коже је почела да се спроводи током јула месеца 2016. године. Упоредно испитивање је извршено на укупно 355 узорака крвних серума крава, 15 узорака колострума и 270 узорака крвних серума телади. Краве, чији су узорци крвних серума испитани у овом истраживању су биле различитог расног састава (црни и црвени холштајн, сименталске расе и мелези ових раса) и старости од две до десет година, добре кондиције и без клиничких симптома болести у моменту узорковања крви.

Слика 8. Приказ заражених подручја LSD током 2016. године и подручја са којих је вршено узорковање.



#### **4.1.1. Узорци крвних серума говеда из банке серума Научног института за ветеринарство „Нови Сад“.**

Методом случајног избора из банке серума НИВ-НС испитано је 125 узорака крвних серума крава прикупљених током 2015. и до 01.06. 2016. године, тј. пре појаве болести квргаве коже у Србији. Из 2015. године је испитано 94 узорака крвних серума крава, а из 2016. године је испитано 31 узорак крвних серума крава. Краве, чији су узорци испитани, су потицале из 52 различита газдинства. Идентификациони бројеви ушних маркица испитаних крава су дати у Прилогу 1.

#### **4.1.2. Узорци крвних серума вакцинисаних крава**

Вакцинација говеда против LSD у Републици Србији се током друге половине 2016. године спроводила живом атенуираном вакцином „*OBP Lumpy Skin Disease*“ (Onderstepoort, Biological Products) по упутству прозвођача. Узорци крвних серума вакцинисаних крава су прикупљени у различитим временским интервалима: на дан вакцинације (0 дана), а потом 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 и 120 дана после спроведене вакцинације. Краве су биле вакцинисане у августу месецу 2016. године, а узорковање је вршено током јесени 2016. године. Узорци крви су узимани од насумично одабраних 20 крава са једне фарме у следећим временским интервалима: на дан вакцинације (0 дана), 10, 20, 30, 45, 60, 75 дана после вакцинације. На тај начин је од истих 20 крава прикупљено 140 узорака крвних серума. Од 20 крава са 4 газдинства са индивидуалним држањем узорковање крви је вршено 90 дана након вакцинације. Такође је и 105 дана након вакцинације вршено узорковање крви од 20 крава пореклом са 3 газдинстава. 120 дана након вакцинације узорковање крви је вршено од 20 крава са једне фарме. На тај начин је укупно прикупљено 200 узорака крви од вакцинисаних крава. Идентификациони бројеви ушних маркица, као и подаци везани за датум вакцинације, старост и расу испитаних крава приказани су у Прилогу 2.

#### 4.1.3. Узорци крвних серума и колострума вакцинисаних крава и узорци крвних серума њихове телаци

Узорци крви код 15 крава са једне фарме (Фарма 1) прикупљени су непосредно после партуса у септембру и октобру 2017. године. Вакцинација крава је спроведена током августа месеца 2016. и 2017. године. Вакцинација говеда против LSD у Републици Србији се током друге половине 2016. године спроводила живом атенуисаном вакцином „*OBP Lumpy Skin Disease*“ (Onderstepoort, Biological Products) по упутству прозвођача, док се током 2017. године вакцинација говеда против LSD спроводила живом атенуисаном вакцином „*Bovivax LSD-N*“ (MCI Sante Animale) такође по упутству прозвођача. Обе вакцине садрже живи атенуисани LSD вирус Neethling сој. Са друге фарме (Фарма 2) узорковање крви и колострума је вршено код 15 крава такође непосредно после партуса у јануару 2018. године, а вакцинација ових крава је спроведена током августа месеца 2016. и 2017. године. Узорци крви од 30 телаци пореклом од вакцинисаних крава са две фарме су прикупљени у различитим временским интервалима: 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 и 120 дана после рођења. На тај начин је укупно прикупљено: 30 узорака крвних серума вакцинисаних крава, 15 узорака колострума и 270 узорака крвних серума телаци. На обе фарме се водило рачуна да се свако теле у првих 48 сати од рођења напаја колострумом од своје мајке, а након тога млеком до залучења. Детаљан опис технологије узгоја телаци на Фарми 1 и Фарми 2 је приказан у Прилогу 3 и 4. Идентификациони бројеви ушних маркица крава и њихове телаци као и датуми телјења на Фарми 1 и Фарми 2 дати су у Прилогу 5.

#### 4.1.4. Материјал коришћен за извођење ELISA методе

- Комерцијални кит *ID Screen<sup>®</sup> Capripox Double Antigen Multi-species*, произвођача *IDvet* (France), Lot: B54 који садржи: микротитар плоче обложене пречишћеним антигеном вируса богиња оваца и коза, концентровани коњугат, позитивни и негативни контролни серум, дилуент *Dilution Buffer 19* и *Dilution Buffer 12*, концентровани раствор за испирање *Wash Concentrate*, раствор субстрата и *Stop* раствор.
- Дестилована вода

- Наставци за микропипете за једнократну употребу (Sarstedt, Немачка).
- ELISA чамчићи (Eppendorf, Немачка).
- Лабораторијске чаше и мензура.

За извођење ELISA методе коришћена је следећа опрема: фрижидер са температуром 2-8 °C, замрзивач на -20 °C, термостат, ELISA читач (Tecan, Аустрија) и аутоматске вишеканалне и једноканалне микропипете (Eppendorf, Немачка), електрични пипетор (Eppendorf, Немачка).

#### 4.1.5. Материјал коришћен у методи титрације вируса и вирус неутрализационог теста

- Изоловани LSDV (SERBIA/Вујановас/2016) из промењених делова коже оболелог говечета из села Љиљанци, умножен и титриран на континуираној култури ћелија MDBK (ATCC, CCL-22), титра 6,0  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>.
- Континуирана ћелијска линија ћелија MDBK (ATCC, CCL-22) (LGC Standards, Енглеска)
- Стерилне пластичне боце за раст културе ћелија – фласкови (Thermo Scientific Nunc)
- Бактериолошки филтери (Filtropur S 0.45, Sarstedt, Немачка)
- Хранљива подлога за културу ћелија *Eagle MEM* (минимални есенцијални медијум) са *Hepes* пуфером, произвођача *Sigma* (Lot: SLBQ2618V) за титрацију испитујућих серума.
- Хранљива подлога за културу ћелија *Eagle MEM* (минимални есенцијални медијум) са *Hepes* пуфером, произвођача *Sigma* (Lot: SLBQ2618V) са 10% феталног говеђег серума, произвођача *Capricorn* (Lot: CP16-1377) за одржавање културе ћелија.
- Мешавина антибиотика (пеницилин 300000 UI, тилозин 200mg и гентамицин 80mg)
- Стерилне комерцијалне микротитар плоче за културу ћелија са равним дном, од 96 базенчића произвођача *Sarstedt* (Lot: 2079082).

- Стерилни наставци за микропипете за једнократну употребу (Sarstedt, Немачка).
- Позитивни контролни серум пореклом од оболелог говечета из села Љиљанци инактивисан на температури од 56 °С у трајању од 30 минута.
- Негативан контролни серум – фетални телећи серум произвођача *Capricorn* (Lot: CP16-1377)

За извођење метода изолације и ВНТ коришћена је следећа опрема: инвертни микроскоп СК-Вi (*Olympus*), фрижидер са температуром 2-8 °С, замрзивач на -20 °С, водено купатило, термостат на 37 °С, ламинарна комора, центрифуга, вортекс мешалица и аутоматске вишеканалне и једноканалне микропипете (Eppendorf, Немачка), електрични пипетор (Eppendorf, Немачка).

## 4.2. МЕТОДЕ

### 4.2.1. Припрема крвних и колостралних серума

Након узорковања крви у вакутајнере, узорци су допремани у лабораторију, где су складиштени на собној температури неколико сати ради издвајања крвног серума. Крвни серум је затим микропипетама пребачен из вакутајнера у стерилне епрувете запремине 1,5 ml и узорци су до испитивања складиштени на температури од -20 °С. Узорци у којима се крвни серум није издвојио у довољној количини је центрифугован у трајању од 5 минута на 2500 обртаја/min, а затим је добијени супернатант крвног серума одливен у епрувете и складиштен на температури од -20 °С.

Узорци колострума су након узорковања допремани у лабораторију, где су загрејани у термостату на 37 °С током сат времена. Затим је додато 0,5 ml сирила ("Sirela & Co" Чачак) на 50 ml загрејаног колострума. Колоструми су затим враћени у термостат на 37 °С још 24 сата. Након 24 сата издвојени колострални серуми (око 20 ml по узорку) су пребачени у кивете и до испитивања складиштени на температури од -20 °С. Колострални серуми који су били замућени су центрифуговани у трајању од 5

минута на 2500 обртаја/min, а добијени супернатант је одливен у кивете и складиштен на температури од -20 °C.

#### 4.2.2. Комерцијални ELISA сет кит

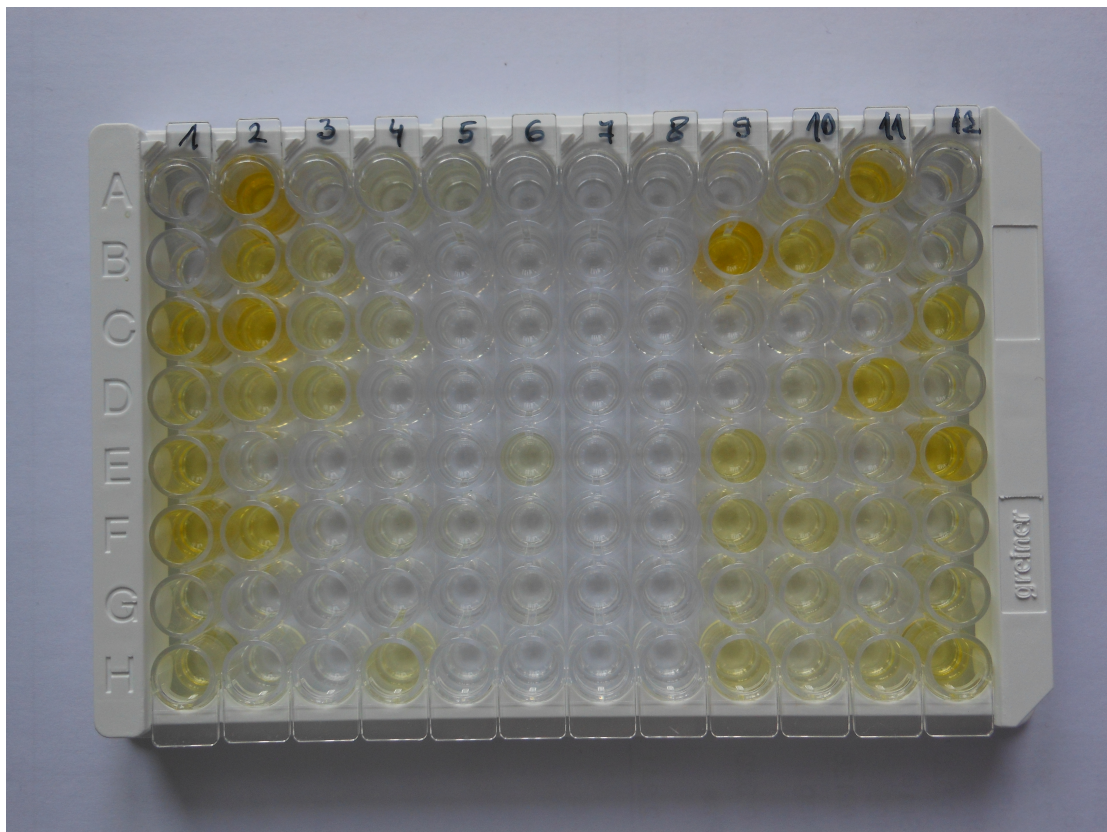
За ELISA метод коришћен је комерцијални кит *ID Screen<sup>®</sup> Capripox Double Antigen Multi-species*, произвођача *IDvet* (France), Lot: B54. Овај ELISA кит је заснован на принципу антигенске сличности за детекцију антитела против SPV и GPV и LSDV. Базенчићи микротитар плоче овог кита су обложени пречишћеним антигеном вируса богиња оваца и коза. Коњугат је пречишћени антиген вируса богиња оваца и коза, који је коњугован ензимом пероксидаза (Horse-radish peroxidase HRP). Коњугат се везује за слободне фрагменте Fab антитела серума који се испитују, а која су везана за пречишћени антиген вируса богиња оваца и коза. Специфичност овог теста, по испитивањима произвођача, је врло висока и у регионима слободним од CaV-а износи >99,7%. Такође произвођач наводи побољшану осетљивост у односу на ВНТ, са могућношћу детекције антитела од 20 дана све до 7 месеци после вакцинације.

Извођење ELISA методе вршено је по упутству произвођача сет кита:

- У сваки базенчић микротитар плоче од 96 базенчића је додато 50 µl раствора за расварање серума (Dilution Buffer 19).
- У базенчиће А1 и В1 додато је 50 µl негативног контролног серума.
- У базенчиће С1 и D1 додато је 50 µl позитивног контролног серума.
- У остале базенчиће је додато по 50 µl испитујућих серума.
- Микротитар плоча је поклопљена и инкубирана у термостату 90 минута на 21°C.
- Након инкубације сваки базенчић микротитар плоче је испран пет пута са 300 µl претходно припремљеног раствора за испирање (Wash Concentrate је растворен у односу 1/20 у дестилованој води).
- Затим је додато 100 µl претходно припремљеног коњугата (Концентровани коњугат је растворен у односу 1/10 у раствору за растварање коњугата – Dilution Buffer 12).
- Микротитар плоча је поклопљена и инкубирана у термостату 30 минута на 21°C.

- Након 30 минута, поновљен је поступак испирања.
- У сваки базенчић микротитар плоче је додато 100  $\mu$ l раствора субстрата који у реакцији са ензимом мења боју у плаву.
- Микротитар плоча је поклопљена и инкубирана у мраку 15 минута на 21°C.
- Додато је 100  $\mu$ l раствора за заустављање реакција (Stop solution) у сваки базенчић, чиме се боја мења у жуту и вредности оптичке густине су очитане на таласној дужини од 450 nm на ELISA читачу (Слика 9).

Слика 9. Изглед микротитар плоче након додавања Stop раствора у ELISA тесту. Интензитет обојености базенчића жутом бојом је сразмеран количини антитела у узорку. Базенчићи А1 и В1 садрже негативни контролни серум, док базенчићи С1 и D1 садрже позитиван контролни серум.



Тумачење резултата испитивања се врши на основу утврђеног интензитета обојености – оптичке густине (OD – optical density) контролних узорака и серума који се испитују на ELISA читачу, при таласној дужини од 450 nm. Резултати испитивања се дефинишу на основу израчунатог S/P односа (Формула 1). Израчунавање S/P односа се врши дељењем разлике OD вредности узорка који се испитивао и средње

OD вредности негативног контролног серума, са разликом средње OD вредности позитивног и негативног контролног серума. Добијени количник се множи са 100 и уколико је S/P однос већи од 30%, испитивани узорак се дефинише као позитиван.

Формула 1. Формула за израчунавање S/P односа

$$S/P = \frac{OD X - OD NC}{OD PC - OD NC} \times 100$$

X – очитана OD вредност испитујућег серума

NC – средња вредност очитаних OD негативног контролног серума

PC – средња вредност очитаних OD позитивног контролног серума

#### 4.2.3. Умножавање вируса болести квргаве коже и модификовани вирус неутрализациони тест

Модификовани ВНТ је извођен коришћењем изолованог LSDV (SERBIA/Buјanovac/2016) из промењених делова коже оболелог говечета из села Љиљанци, општина Бујановац. Изоловани вирус је умножен и титриран на континуираној култури ћелија MDBK (ATCC, CCL-22). За извођење ВНТ коришћен је вирус после четврте пасаже, титра  $6,0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> и континуирана култура ћелија MDBK. MDBK култура ћелија се умножава у бочицама (флашковима) од 25 cm<sup>2</sup>, а одвајање ћелија је вршено додавањем раствора трипсина EDTA у флашкове са потпуно израслим монослојем ћелија. На суспензију ћелија је наливена хранљива подлога за културу ћелија *Eagle MEM* (минимални есенцијални медијум) са *Hepes* пуфером и 10% феталног говеђег серума. Концентрација суспензије ћелија коришћена у ВНТ је износила 185000 ћелија/ml.

Поступак извођења модификованог вирус неутрализационог теста:

- ВНТ мора да садржи следеће контроле:
- Контролу позитивног серума (вредности титра антитела против LSDV од  $4 \pm 1 \log_2$ )



- Контролу негативног серума (фетални говеђи серум)
- Контролу ћелија у 8 базенчића.
- Контролу радног вируса од 100 TCID<sub>50</sub> у 8 базенчића.
- Повратну – „Back титрацију коришћеног вируса, са следећим разређењима вируса: 10, 1 и 0 TCID<sub>50</sub> у 50 µL у 8 базенчића микротитар плоче за свако разређење. (Шема 1)

Шема 1. Пример шеме микротитар плоче са планом и редоследом nanoшења контрола и 4 испитујућа серума.

	1	2	3	4*	5*	6*	7*	8*	9	10	11	12
<b>A</b>	(+) 1:2	(-) 1:2	Контрола ћелија	Контрола вируса од 100 TCID <sub>50</sub>	Контрола вируса од 10 TCID <sub>50</sub>	Контрола вируса од 1 TCID <sub>50</sub>	Контрола вируса од 0 TCID <sub>50</sub>	Контрола вируса од 0 TCID <sub>50</sub>	(1) 1:2	(2) 1:2	(3) 1:2	(4) 1:2
<b>B</b>	1:4	1:4							1:4	1:4		
<b>C</b>	1:8	1:8							1:8	1:8		
<b>D</b>	1:16	1:16							1:16	1:16		
<b>E</b>	1:32	1:32							1:32	1:32		
<b>F</b>	1:64	1:64							1:64	1:64		
<b>G</b>	1:128	1:128							1:128	1:128		
<b>H</b>	1:256	1:256							1:256	1:256		

(x) – испитујући серум

\* - Back титрација радног вируса

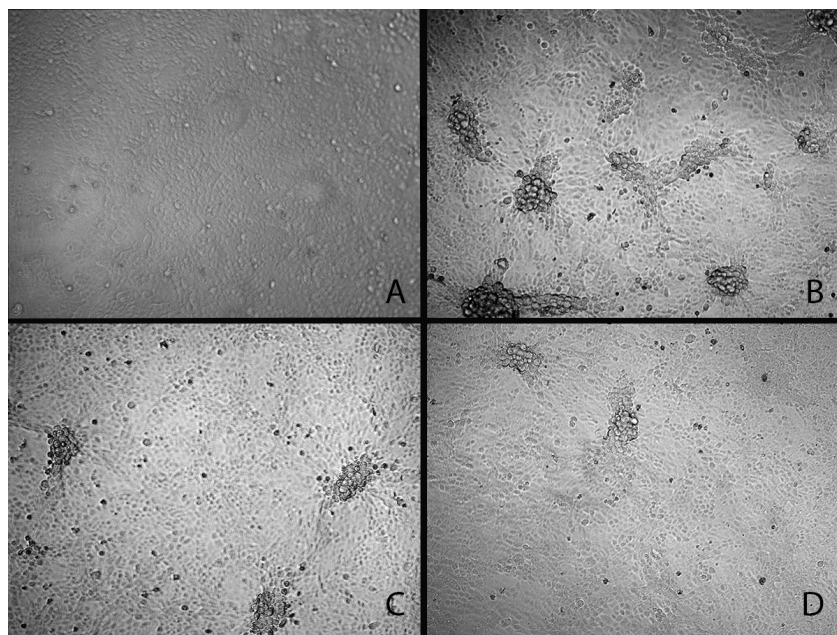
(+) – Позитивни контролни серум

(-) – Негативни контролни серум

- У све базенчиће микротитар плоче, осим базенчића за контролу вируса, контролу ћелија и повратну „Back“ титрацију вируса, нането је по 50 µL хранљиве подлоге за културу ћелија. Потом је спроведена титрација контролних серума и испитујућих серума у запремини од 50 µL, од разређења 1 до 8 log<sub>2</sub>.
- Испитујући серуми су пре почетка извођења теста инактивисани у воденом купатилу на температури од 56 °C у трајању од 30 минута.
- На разређене контролне тест серуме и испитујуће серуме додато је 50 µL радног вируса са 100 TCID<sub>50</sub>.

- Након један сат инкубације микротитар плоча на собној температури, на контролне серуме и испитујуће серуме додата је суспензија ћелија у запремини од 100  $\mu\text{L}$  по базенчићу и концентрацији од 185000 ћелија/ml.
- Микротитар плоче су облепљене парафилмом и инкубиране 3 дана (72 сата) у термостату на 37  $^{\circ}\text{C}$ , а потом је уследило читавање резултата, односно утврђивање појаве ЦПЕ LSDV.
- Читавање резултата – критеријуми:
  - Титар вируса у повратној „Back“ титрацији се морао кретати у распону од 30 до 300 TCID/50 (Слика 10).
  - У контроли ћелија није се смела запазити појава ЦПЕ.
  - Титар антитела у контролном позитивном серуму морао је износити  $4 \pm 1 \log_2$ .
  - Титар антитела у негативном контролном серуму морао је бити  $0 \log_2$ .
  - Очитани титар антитела у испитујућим серумима представљао је последње разређење серума у којем није утврђена појава ЦПЕ вируса.
  - Утврђени титар антитела од  $1 \log_2$  и већи се сматрао позитивним налазом на присуство антитела против вируса LSD.

Слика 10. Приказ повратне Back титрације вируса болести кржаве коже. (A) контрола MDBK културе ћелија, (B) ЦПЕ LSDV 100 TCID/50, (C) ЦПЕ LSDV 10 TCID/50, (D) ЦПЕ LSDV 1 TCID/50.



#### 4.2.4. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата добијених у овом истраживању коришћен је *kappa* тест према: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=Compare2Tests>, а за утврђивање специфичности и осетљивости поређених метода коришћени су подаци из: *Veterinary Epidemiology 3<sup>rd</sup> Edition* (Thrusfield, 2007). За поређење резултата испитивања антитела против LSDV код вакцинисаних крава и телди на Фарми 1 и Фарми 2 методама ELISA тест и ВНТ, као и поређење резултата испитивања антитела против LSDV у узорцима колостралних и крвних серума крава на Фарми 2 методама ELISA тест и ВНТ коришћени су Хи квадрат тест ( $\chi^2$ ) и Mann-Whitney U тест.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ У УЗОРЦИМА КРВНИХ СЕРУМА ГОВЕДА ИЗ БАНКЕ СЕРУМА НАУЧНОГ ИНСТИТУТА ЗА ВЕТЕРИНАРСТВО "НОВИ САД"

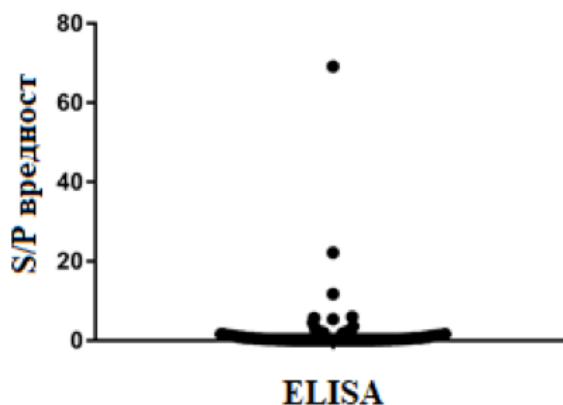
Резултати утврђивања антитела против LSDV методама ELISA и ВНТ у 125 узорка крвних серума говеда из банке серума НИВ-НС су приказани у Табели 3.

Табела 3. Резултати утврђивања антитела против LSDV у узорцима из банке серума НИВ-НС.

Број испитаних узорка	ELISA		ВНТ	
	+	-	+	-
125	1	124	0	125

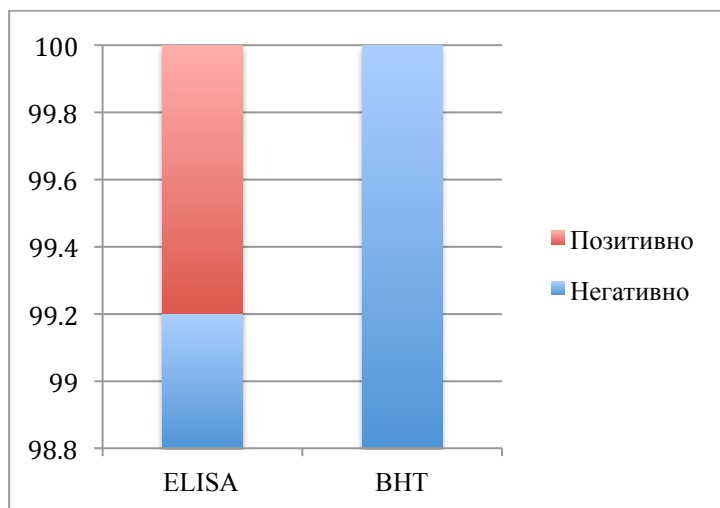
Укупно је испитано 125 узорка крвних серума говеда из банке серума НИВ-НС. ELISA методом позитиван налаз је утврђен у једном узорку (0,8%), чија је вредност S/P односа износила 69,19%, док је негативан налаз утврђен у 124 узорка (99,2%). S/P вредности у узорцима са негативним налазом су се кретале од 0,00% до 22,17%. Просечна вредност S/P односа у узорцима испитаних ELISA је износила 1,55%.

Графикон 1. Приказ вредности S/P односа у узорцима крвних серума говеда из банке серума испитаних ELISA методом



Узорци крвних серума говеда из банке серума НИВ-НС су испитани и методом ВНТ, и утврђен је негативан налаз антитела против вируса LSD у свих 125 испитаних узорака (100%). Вредности титра антитела и S/P односа свих 125 узорака из банке серума испитаних ВНТ и ELISA методом су приказани у табели у Прилогу 1.

Графикон 2. Резултати испитивања узорака крвних серума говеда из банке серума методама ELISA и ВНТ



## 5.2. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ У УЗОРЦИМА КРВНИХ СЕРУМА ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА

Резултати утврђивања антитела против LSDV методама ELISA и ВНТ у 200 узорака крвних серума вакцинисаних крава су приказани у Табели 4.

Табела 4. Резултати утврђивања антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава.

Број испитаних узорака	ELISA		ВНТ	
	+	-	+	-
200	60	140	68	132

+ број узорака са позитивним налазом антитела, - број узорака са негативним налазом антитела

Укупно је испитано 200 узорака крвних серума вакцинисаних крава. ELISA методом је утврђено 60 узорака (30%) са позитивним налазом антитела, док је 140 узорака (70%) било са негативним налазом на присуство антитела против LSDV. ВНТ је утврђено 68 узорака (34%) са позитивним налазом на присуство антитела против LSDV, док је 132 узорка (66%) било негативно.

У табели 5 су приказани резултати испитивања крвних серума вакцинисаних крава по терминима узорковања са приказаним S/P вредностима (ELISA) и вредностима титра антитела  $\log_2$  (ВНТ).

Табела 5. Резултати испитивања методама ELISA (S/P %) и ВНТ ( $\log_2$ ) код вакцинисаних крава.

Број дана након вакцинације крава	Број крава по термину	ELISA		ВНТ	
		Број крава са + налазом	Вредности S / P %	Број крава са + налазом	Вредности титра $\log_2$
0 дана *	20	0	0–5,70	0	0
10 дана *	20	0	0–1,71	0	0
20 дана *	20	2	50,73 и 63,80	6	3–5
30 дана *	20	13	29,97–170,47	15	3–6
45 дана *	20	8	120,98–147,66	8	5–6
60 дана *	20	7	120,14–141,51	7	4–5
75 дана *	20	6	53,96–206,99	7	1–5
90 дана	20	8	58,36–249,47	8	1–6
105 дана	20	8	80,27–236,45	9	1–6
120 дана	20	8	42,39–270,19	8	1–7

\* у терминима обележеним звездицом је узорковање вршено код истих 20 крава

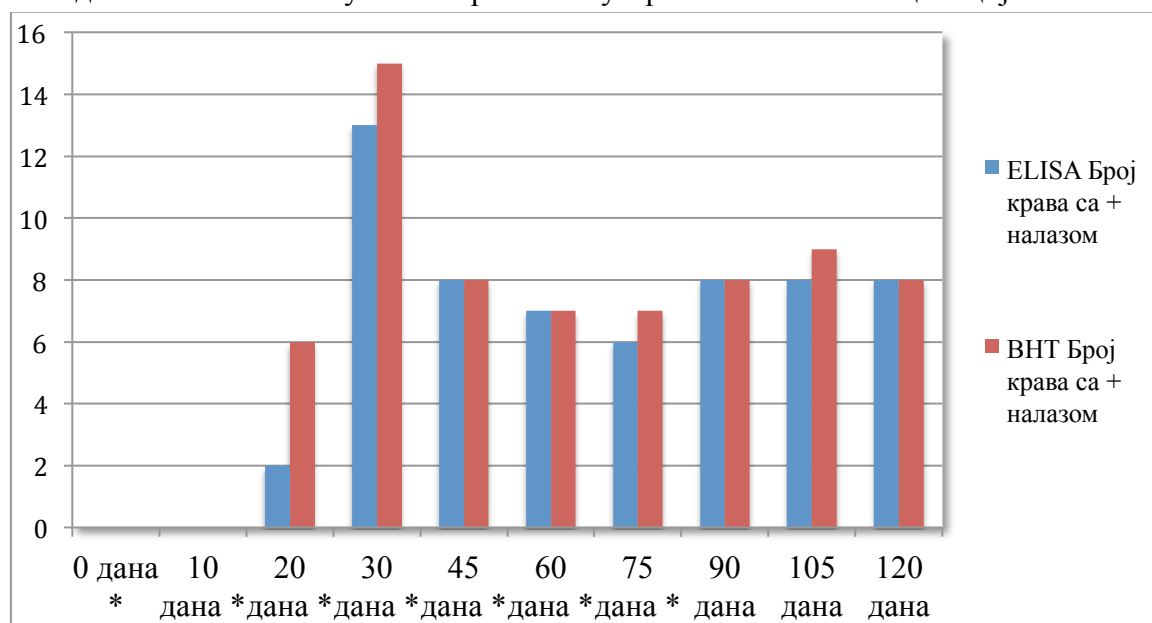
Према подацима приказаних у Табели 5 може се видети да су први позитивни налази антитела против LSDV и ELISA тестом и ВНТ утврђени 20 дана након вакцинације, с тим да је ELISA тестом присуство антитела утврђено у 2 узорка (10%)

од укупно 20 испитаних, а ВНТ је присуство антитела утврђено у 6 узорака (30%). Вредности S/P односа у узорцима са позитивним налазом су износиле 50,73% и 60,83%, док су се вредности титра антитела у ВНТ кретале од  $3\log_2$  до  $5\log_2$ . Највећи број животиња са позитивним налазом антитела против LSDV утврђен је 30 дана након вакцинације. ELISA тестом су антитела утврђена у 13 узорака (65%), са вредностима S/P односа од 29,97% до 170,47%. ВНТ је позитиван налаз утврђен у 15 узорака (75%), а вредности титра антитела су се кретале од  $3\log_2$  до  $6\log_2$ . Анализом резултата оба теста код истих вакцинисаних крава, може се видети да се број животиња са позитивним налазом антитела против LSDV смањило скоро за 50% 45, 60 и 75 дана након вакцинације. ELISA тестом и ВНТ је присуство антитела је утврђено у истом броју узорака (8) и 45 и 60 дана након вакцинације. Није било значајног смањења, ни у вредностима S/P односа, ни у вредностима титра антитела, чије су се вредности кретале од 120,14% до 147,66% и од  $4\log_2$  до  $6\log_2$ . 75 дана након вакцинације, ELISA тестом је утврђен позитиван налаз антитела против LSDV у 6 узорака, док је ВНТ позитиван налаз утврђен у 7 узорака. Вредности S/P односа су се кретале од 53,96% до 206,99%, док је дошло до мањег пада вредности титра антитела које су се кретале од од  $1\log_2$  до  $5\log_2$ . Позитивни налаз антитела против LSDV ELISA тестом је утврђен 90, 105 и 120 дана након вакцинације код 8 крава (40%). Тестирањем истих узорака ВНТ, позитиван налаз антитела код 8 крава је утврђен 90 и 120 дана након вакцинације, док је 105 дана након вакцинације позитиван налаз имало 9 крава (45%). Вредности S/P односа и титра антитела су се кретале у сличним интервалима у сва три последња термина узорковања и износила су од 42,39% до 270,19% и од  $1\log_2$  до  $7\log_2$ .

Антитела против LSDV утврђена ELISA тестом и ВНТ су такође била и квантификована. Према приказаним подацима у Табели 5 се види да су вредности S/P односа у позитивним узорцима испитаних ELISA методом износиле од 29,97% до 270,19%, а вредности титра антитела у позитивним узорцима испитаних ВНТ износиле од  $1\log_2$  до  $7\log_2$ .

Графички приказ упоредног испитивања крвних серума вакцинисаних крава методама ELISA и ВНТ у различитим терминима узорковања дат је у Графикону 3.

Графикон 3. Упоредни приказ испитивања крвних серума вакцинисаних крава методама ELISA и ВНТ у свим терминима узорковања након вакцинације.



\* у терминима обележеним звездицом је узорковање вршено код истих 20 крава

### 5.2.1. Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава ELISA методом

Ради утврђивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава ELISA методом је укупно прегледано 200 узорака. Од 20 истих крава са једне фарме је укупно узорковано 140 узорака крвних серума у следећим временским интервалима: на дан вакцинације (дан 0), 20, 30, 45, 60 и 75 дана после вакцинације. Резултати испитивања 140 узорака пореклом од вакцинисаних крава са једне фарме ELISA методом су приказани у Табели 6.



Табела 6. Резултати испитивања узорака крвних серума вакцинисаних крава са једне фарме ELISA методом-приказане су вредности S/P односа (%).

Редни бр.	ELISA - Вредности S/P односа (%)						
	дан 0*	10 дана*	20 дана*	30 дана*	45 дана*	60 дана*	75 дана*
1	1,20	0,00	9,07	<b>29,97</b>	0,92	0,00	0,00
2	2,10	0,00	11,91	25,33	1,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	<b>30,06</b>	0,00	0,00	0,00
4	0,00	1,71	0,69	25,07	0,46	0,00	0,00
5	0,10	0,00	14,45	<b>34,61</b>	0,00	0,00	0,00
6	0,90	0,00	0,00	<b>33,36</b>	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	<b>168,24</b>	<b>135,97</b>	<b>141,51</b>	<b>206,99</b>
8	4,50	0,00	6,53	<b>168,06</b>	<b>147,66</b>	<b>130,21</b>	<b>136,97</b>
9	0,90	0,00	0,00	<b>170,47</b>	<b>120,98</b>	<b>123,44</b>	<b>123,14</b>
10	5,70	0,00	0,00	<b>155,49</b>	<b>134,28</b>	<b>120,14</b>	<b>100,46</b>
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,53
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,00	1,92	0,00	0,31	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	<b>35,06</b>	0,00	1,77	0,31
15	0,00	0,00	<b>63,80</b>	<b>34,88</b>	0,00	0,00	0,00
16	1,60	0,00	<b>50,73</b>	<b>35,43</b>	0,00	0,00	0,00
17	1,30	0,00	21,68	<b>35,97</b>	<b>131,59</b>	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	<b>34,90</b>	<b>127,59</b>	<b>135,13</b>	<b>53,96</b>
19	0,20	0,00	0,00	0,00	<b>144,73</b>	<b>136,89</b>	<b>95,39</b>
20	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>146,35</b>	<b>136,36</b>	13,68

\*број дана након вакцинације

Према резултатима приказаним у Табели 6 се види да у прва два узорковања није било позитивних налаза на присуство антитела против LSDV. Антитела на мерљивом нивоу су почела да се јављују тек 20 дана након вакцинације, и то само код две краве број, 15 и 16, са вредностима S/P односа 63,80% и 50,73%. Док се 30 дана након вакцинације може уочити највећи број крава (13) са позитивним налазом на присуство антитела против LSDV. Код крава број 15 и 16 долази до смањења количине антитела у серуму, што се уочава и у вредностима S/P односа, које 30

дана након вакцинације износе 34,88% и 35,43%. Краве број 1, 2, 5 и 6 су имале позитиван налаз антитела само у термину узорковања спроведеном 30 дана након вакцинације. Код крава број 7, 8, 9 и 10 се уочавају највеће вредности S/P односа у односу на све термине узорковања. Вредности S/P односа код ових крава остају прилично високе и 45, 60 и 75 дана после вакцинације, а крећу се од 100,46% до 206,99%. До смањења броја крава са позитивним налазом антитела (8) долази 45 дана након вакцинације. Код крава број 17 и 18 долази до наглог скока у порасту антитела, тј. вредности S/P односа, које износе 131,59% и 127,59%, док се краве број 19 и 20 први пут појављују са позитивним налазом антитела и вредностима S/P односа 144,73% и 146,35%. Смањивање броја крава са позитивним налазом (7) се наставља и 60 дана након вакцинације, а смањују се и вредности S/P односа у односу на претходни термин узорковања. Крава бр 17 има негативан налаз антитела 60 дана након вакцинације, иако је у претходном термину узорковања имала високу вредност S/P односа. У последњем термину узорковања код ових 20 крава, само је 6 крава је имало позитиван налаз и то краве број 7, 8, 9, 10, 18 и 19, са вредностима S/P односа од 53,96% до 206,99%. Код краве број 7 дошло је до пораста нивоа антитела, што се могло закључити на основу вредности S/P односа, која је у последњем термину износила 200,99%. Код осталих крава са позитивним налазом антитела у последњем термину узорковања вредности S/P односа су биле приближно исте или нешто ниже у односу на претходни термин узорковања.

Присуство антитела против болести квргаве коже ELISA методом је праћено и у 60 узорака крвних серума вакцинисаних крава са различитих газдинстава у три временска термина: 90, 105 и 120 дана након вакцинације. У сваком термину узорковања су узорци потицали од 20 различитих крава. Резултати испитивања 60 узорака пореклом од различитих вакцинисаних крава ELISA методом су приказани у Табели 7.

Табела 7. Резултати испитивања узорака крвних серума вакцинисаних крава са различитих газдинстава ELISA методом-приказане су вредности S/P односа (%)

Редни бр.	ELISA - Вредности S/P односа (%)				
	90 дана*	Редни бр.	105 дана*	Редни бр.	120 дана*
1	0,00	1	0,00	1	155,20
2	214,23	2	1,96	2	10,54
3	249,47	3	0,68	3	0,00
4	7,00	4	0,00	4	0,00
5	14,23	5	139,46	5	0,30
6	0,15	6	236,45	6	1,88
7	5,72	7	0,15	7	2,33
8	58,36	8	121,61	8	52,41
9	3,31	9	150,08	9	0,00
10	64,16	10	4,74	10	206,25
11	0,00	11	0,00	11	180,65
12	128,01	12	80,27	12	0,38
13	7,76	13	149,32	13	180,27
14	0,00	14	0,00	14	42,39
15	0,00	15	180,87	15	141,42
16	0,00	16	0,00	16	1,35
17	0,00	17	0,00	17	0,00
18	213,21	18	107,28	18	270,19
19	174,34	19	15,33	19	0,59
20	58,43	20	0,00	20	0,00

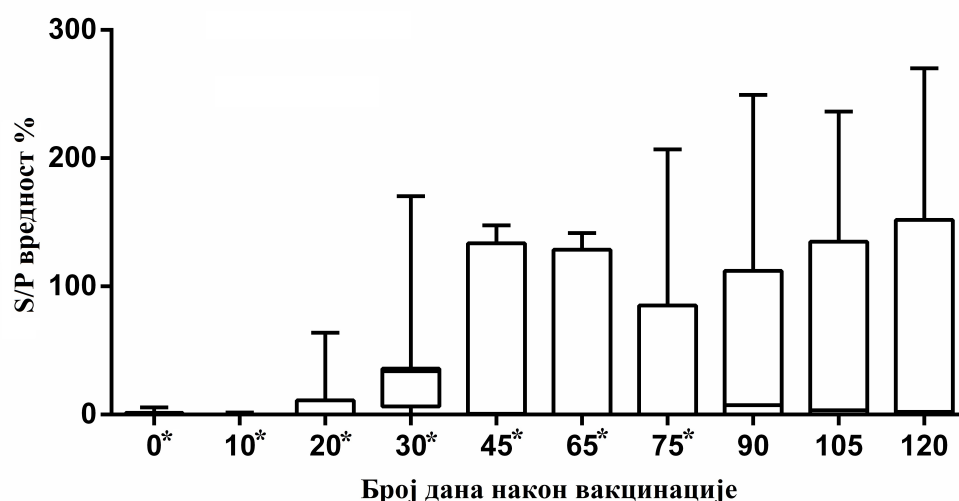
\*број дана након вакцинације

Анализом подака приказаним у Табели 7 уочава се да је у сва три термина узорковања, тј. 90, 105 и 120 дана након вакцинације утврђен исти број крава (8) са позитивним налазом антитела против LSDV. Вредности S/P односа су биле прилично различите у сва три термина узорковања и кретале су се од 42,39% до 270,19%. Више од половине крава са позитивним налазом антитела (18/24) у последња три термина узорковања су имале високе вредности S/P односа (више од 100%), односно висок ниво антитела у серуму. На крају је значајно нагласити да је антитела било могуће

детектовати код скоро половине испитаних крава (24/60) и 90, 105 и 120 дана након вакцинације.

Вредности S/P односа у испитаним крвним серумима вакцинисаних крава у свим терминима узорковања ELISA методом су графички приказани у Графикону 4.

Графикон 4. Приказ вредности S/P односа у испитаним крвним серумима вакцинисаних крава у свим терминима узорковања ELISA методом.



\* у терминима обележеним звездicom је узорковање вршено код истих 20 крава

### 5.2.2. Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава методом ВНТ

Методом ВНТ утврђивање присуства антитела против LSDV у извршено је у узорцима крвних серума 200 вакцинисаних крава. Као и у случају тестирања узорака ELISA методом, од 20 истих крава са једне фарме је узорковано 140 узорака крвних серума у следећим терминима: на дан вакцинације (дан 0), 10, 20, 30, 45, 60 и 75 дана после вакцинације. Резултати испитивања 140 узорака вакцинисаних крава са једне фарме ВНТ су приказани у Табели 8.

Табела 8. Резултати испитивања узорака крвних серума вакцинисаних крава са једне фарме ВНТ -приказане су вредности титра антитела ( $\log_2$ ).

Редни бр.	ВНТ – вредности титра антитела ( $\log_2$ )						
	дан 0*	10 дана*	20 дана*	30 дана*	45 дана*	60 дана*	75 дана*
1	0	0	3	3	0	0	0
2	0	0	4	4	0	0	0
3	0	0	0	3	0	0	0
4	0	0	0	3	0	0	0
5	0	0	4	4	0	0	0
6	0	0	0	3	0	0	0
7	0	0	0	6	5	5	5
8	0	0	0	6	5	4	4
9	0	0	0	6	6	4	4
10	0	0	0	6	5	4	3
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	5	0	0	0
15	0	0	5	5	0	0	0
16	0	0	5	5	0	0	0
17	0	0	4	5	5	0	0
18	0	0	0	4	5	5	1
19	0	0	0	0	5	5	3
20	0	0	0	0	5	5	1

\*број дана након вакцинације

Негативан налаз антитела против LSDV код свих 20 испитаних крава 10 и 20 дана након вакцинације утврђен ВНТ, одговара резултатима добијеним и ELISA методом (Таблела 8). Док су ELISA методом само краве број 15 и 16 имале позитиван налаз антитела против LSDV 20 дана након вакцинације, ВНТ је утврђен позитиван налаз антитела код 6 крава, а титар антитела се кретао од  $3\log_2$  до  $5\log_2$ . И ВНТ је највећи број крава са позитивним налазом антитела (15) утврђен 30 дана након вакцинације. Краве бр 2 и 4 су имале позитиван налаз у испитивању одрађеним ВНТ

са тиртом антитела од  $4\log_2$  и  $3\log_2$ , док је ELISA методом утврђен негативан налаз код ових крава, иако се по вредностима S/P односа (25,33% и 25,07%) могло закључити да је мала количина антитела била присутна али и даље испод нивоа детекције (Cut off). Присуство специфичних антитела LSDV код крава број 11, 12, 13, 19 и 20 није утврђено ниједном методом, где је вредност S/P односа од 0% одговарао налазу титра антитела од  $0\log_2$  код свих пет крава. Вредности титра антитела код крава са позитивним налазом су биле прилично високе и износиле су од  $3\log_2$  до  $6\log_2$ . У следећем термину узорковања, односно 45 дана након вакцинације долази до смањења броја крава са позитивним налазом (8). Исти број позитивних налаза 45 дана након вакцинације је утврђен и ELISA методом код истих крава бр. 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19 и 20. Код крава бр. 19 и 20 први позитиван налаз антитела је утврђен у овом термину испитивања. Вредности титра антитела код крава са позитивним налазом су се кретале од  $5\log_2$  до  $6\log_2$ , што је одговарало и високим вредностима S/P односа. Број крава са позитивним налазом антитела наставља да се смањује, тако да је он 60 дана након вакцинације износио 7. Као и у испитивању спроведеном ELISA методом, крава бр.17 је имала негативан налаз у овом термину узорковања, упркос високом титру антитела у претходном термину узорковања. Титар антитела код крава са позитивним налазом је био и даље висок, и био је исти или мало нижи у односу на претходни термин узорковања, те је износио од  $4\log_2$  до  $5\log_2$ . У последњем термину узорковања код крава са исте фарме, позитиван налаз неутрализационих антитела је био утврђен код 7 крава, за разлику од ELISA методе где је у истом термину било утврђено присуство антитела у 6 узорака. Крава број 20 је имала позитиван налаз антитела у последњем термину узорковања са ниским титром антитела од  $1\log_2$ , док је у испитивању ELISA методом налаз био негативан са вредношћу S/P односа од 13,68%. У испитивању вршеном ELISA методом је код краве број 7 у последњем термину узорковања утврђена виша вредност S/P односа него у претходном термину узорковања, док је у испитивању вршеном ВНТ титар антитела остао исти у оба термина  $5\log_2$ . Код крава бр. 8, 9, 10, 18 и 19 које су имале позитиван налаз антитела у последњем термину узорковања, вредности титра антитела биле су сличне или ниже у односу на претходни термин узорковања.

Присуство антитела против LSDV ВНТ је праћено у 60 узорака крвних серума вакцинисаних крава са различитих газдинстава у три термина: 90, 105 и 120 дана након вакцинације. У сваком термину узорковања узорци су потицали од различитих

крава са различитих газдинстава. Резултати испитивања 60 узорака крвних серума пореклом од различитих вакцинисаних крава ВНТ су приказани у Табели 9.

Табела 9. Резултати испитивања узорака крвних серума вакцинисаних крава са различитих газдинстава ВНТ- приказане су вредности титра антитела ( $\log_2$ ).

<b>ВНТ – вредности титра антитела (<math>\log_2</math>)</b>					
<b>Редни бр.</b>	<b>90 дана*</b>	<b>Редни бр.</b>	<b>105 дана*</b>	<b>Редни бр.</b>	<b>120 дана*</b>
<b>1</b>	0	<b>1</b>	0	<b>1</b>	3
<b>2</b>	5	<b>2</b>	0	<b>2</b>	0
<b>3</b>	6	<b>3</b>	0	<b>3</b>	0
<b>4</b>	0	<b>4</b>	0	<b>4</b>	0
<b>5</b>	0	<b>5</b>	4	<b>5</b>	0
<b>6</b>	0	<b>6</b>	6	<b>6</b>	0
<b>7</b>	0	<b>7</b>	0	<b>7</b>	0
<b>8</b>	2	<b>8</b>	4	<b>8</b>	3
<b>9</b>	0	<b>9</b>	3	<b>9</b>	0
<b>10</b>	3	<b>10</b>	0	<b>10</b>	4
<b>11</b>	0	<b>11</b>	0	<b>11</b>	4
<b>12</b>	4	<b>12</b>	4	<b>12</b>	0
<b>13</b>	0	<b>13</b>	4	<b>13</b>	3
<b>14</b>	0	<b>14</b>	0	<b>14</b>	1
<b>15</b>	0	<b>15</b>	5	<b>15</b>	3
<b>16</b>	0	<b>16</b>	0	<b>16</b>	0
<b>17</b>	0	<b>17</b>	0	<b>17</b>	0
<b>18</b>	5	<b>18</b>	4	<b>18</b>	7
<b>19</b>	4	<b>19</b>	1	<b>19</b>	0
<b>20</b>	1	<b>20</b>	0	<b>20</b>	0

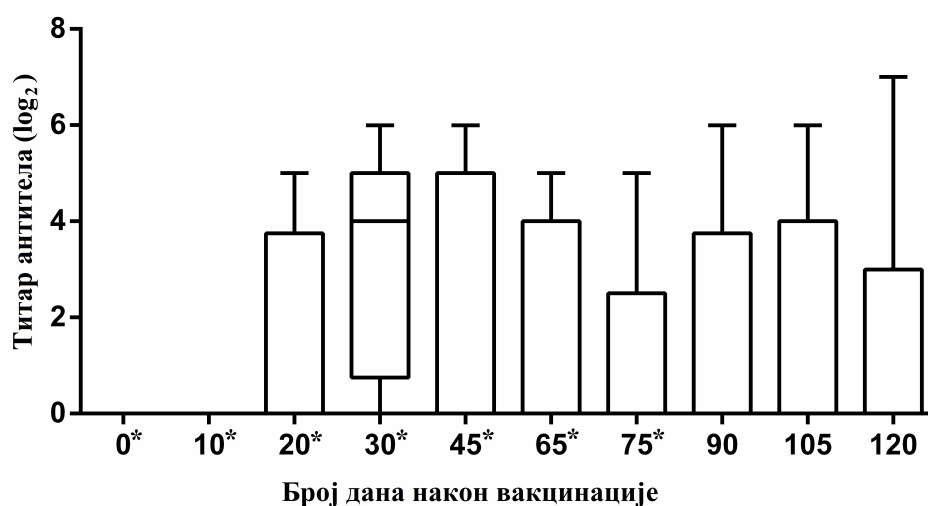
\*број дана након вакцинације

Од укупно прегледаних 60 узорака у три термина узорковања ВНТ је утврђен позитиван налаз антитела против LSDV код 8 крава 90 и 120 дана након вакцинације, док је 105 дана након вакцинације 9 крава имало позитиван налаз антитела. Краве које су имале позитиван налаз у испитивању ELISA методом, имале су позитиван налаз и ВНТ. Титар антитела у сва три термина узорковања се кретао од  $1\log_2$  до  $7\log_2$ . Краве

чији је титар антитела био висок од  $5\log_2$  до од  $7\log_2$  су имале и високе вредности S/P односа, преко 180%. Сразмерно томе, краве чији је титар антитела утврђен ВНТ био нижи су имале и ниже вредности S/P односа утврђеног у испитивању ELISA методом. Само је 105 дана након вакцинације ВНТ утврђено присуство специфичних антитела код краве бр. 19 код које ELISA методом није утврђен позитиван налаз антитела. Крава бр. 19 је 105 дана након вакцинације имала низак титар антитела од  $1\log_2$ , док је вредност S/P односа од 14, 82% указивала на присуство антитела испод нивоа детекције (Cutt Off).

Вредности титра антитела ( $\log_2$ ) у испитаним крвним серумима вакцинисаних крава у свим терминима узорковања методом ВНТ су графички приказани у Графикону 5.

Графикон 5. Приказ вредности титра антитела ( $\log_2$ ) у испитаним крвним серумима вакцинисаних крава у свим терминима узорковања методом ВНТ.



\* у терминима обележеним звездицом је узорковање вршено код истих 20 крава



### 5.3. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ У УЗОРЦИМА КРВНИХ И КОЛОСТРАЛНИХ СЕРУМА ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА И КРВНИХ СЕРУМА ЊИХОВЕ ТЕЛАДИ

Ради утврђивања присуства антитела против LSDV у крвним и колостралним серумима вакцинисаних крава и крвним серумима њихове телади методама ELISA и ВНТ укупно је прегледано 30 узорака крвних серума вакцинисаних крава (Фарма 1 и 2), 15 узорака колостралних серума крава (Фарма 2) и 270 узорака крвних серума њихове телади (Фарма 1 и 2). На обе фарме је узорковање вршено у истим терминима. Код вакцинисаних крава су узорци прикупљени једнократно непосредно после партуса, док је узорковање код телади вршено у различитим терминима након рођења: 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 и 120 дана након вакцинације. Резултати упоредног испитивања узорака крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади са Фарме 1 методама ELISA и ВНТ су приказани у Табели 10.

Табела 10. Резултати испитивања антитела против LSDV код вакцинисаних крава и њихове телади – Фарма 1.

Фарма 1		ELISA		ВНТ	
		+	-	+	-
краве	кр.серум	10	5	10	5
телад	10 дана*	9	6	11	4
	20 дана*	9	6	11	4
	30 дана*	6	9	8	7
	45 дана*	6	9	6	9
	60 дана*	4	11	4	11
	75 дана*	3	12	3	12
	90 дана*	3	12	3	12
	105 дана*	3	12	2	13
	120 дана*	2	13	1	14

\* број дана након рођења телета, + број позитивних јединки, - број негативних јединки

Резултати упоредног испитивања антитела против LSDV методама ELISA и ВНТ у узорцима крвних серума вакцинисаних крава са Фарме 1 су показали да је 10

крава (66,67%) имало позитиван налаз антитела, док је код 5 крава (33,33%) налаз био негативан. Упоредивањем резултата код телаци, може се видети да је 10 и 20 дана након рођења утврђен највећи број позитивних налаза антитела и то ELISA методом код 9 телаци (60%), а ВНТ код 11 телаци (73,33%). Такође је 30 дана након рођења ВНТ утврђен већи број позитивних налаза у односу на ELISA методу, тј. 8 (53,33%) и 6 (40%). У следећим терминима узорковања: 45, 60, 75 и 90 дана након рођења долази до постепеног смањења броја телаци са позитивним налазом, док је у споменутиим терминима узорковања обема методама утврђен једнак број позитивних телаци и то редом 6 (40%), 4 (26,67%), 3 (20%) и 3 (20%). Већ 105 дана након рођења, број телаци са позитивним налазом је био веома мали, ELISA методом је утврђено 3 (20%) позитивна налаза, а ВНТ свега 2 (13,33%). У последњем термину узорковања код телаци, 120 дана након рођења, ELISA методом је позитиван налаз утврђен код 2 телета (13,33%), а ВНТ код 1 телета (6,67%). У прва два термина узорковања већи број телаци са позитивним налазом утврђен је методом ВНТ, док је у последња два термина узорковања већи број телаци са позитивним налазом утврђен ELISA методом.

Резултати упоредног испитивања узорака крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвних серума њихове телаци са Фарме 2 методама ELISA и ВНТ су приказани у Табели 11.

Табела 11. Резултати испитивања антитела против LSDV код вакцинисаних крава и њихове телаци – Фарма 2.

Фарма 2		ELISA		ВНТ	
		+	-	+	-
краве	кр.серум	9	6	12	3
	кол.серум	13	2	13	2
телад	10 дана	14	1	14	1
	20 дана	14	1	13	2
	30 дана	13	2	10	5
	45 дана	9	6	6	9
	60 дана	6	9	3	12
	75 дана	4	11	1	14
	90 дана	2	13	0	15
	105 дана	0	15	0	15
120 дана	0	15	0	15	

\* број дана након рођења телета, + број позитивних јединки, - број негативних јединки

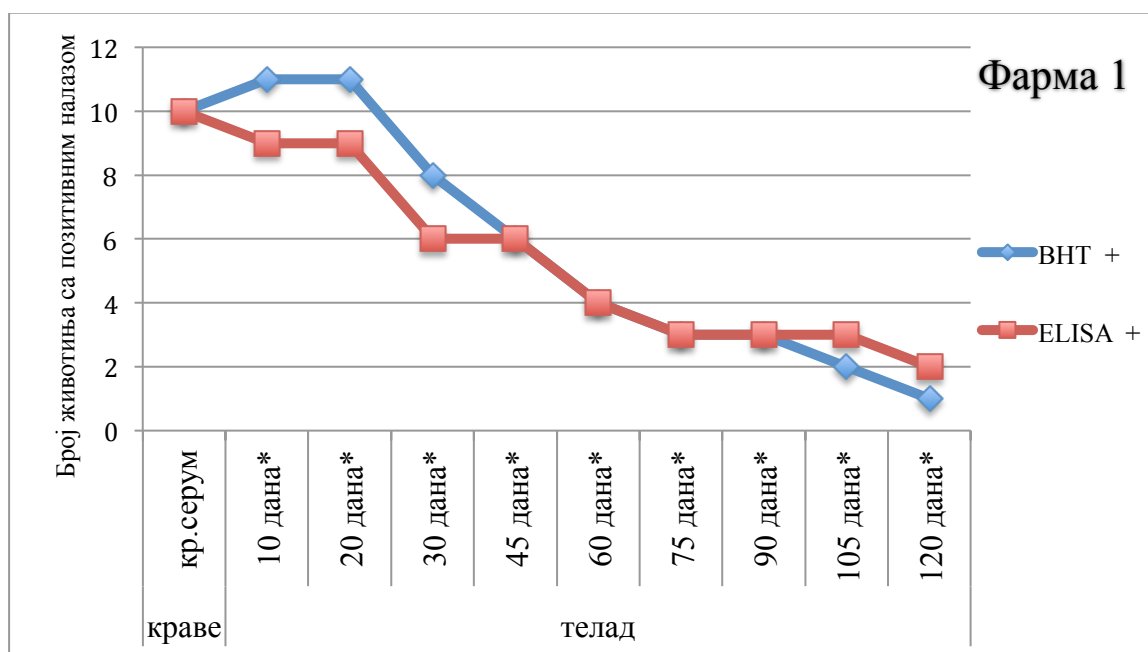
Резултати упоредног испитивања крвних и колостралних серума крава са Фарме 2 на присуство антитела против LSDV су показали да је у узорцима крвних серума ELISA методом утврђено 9 крава (60%) са позитивним налазом, док је ВНТ утврђено 12 крава (80%) са позитивним налазом антитела. У 13 узорака (86,67%) колостралних серума је обема методама потврђено присуство антитела против LSDV. Применом  $\chi^2$ -теста није установљена статистички значајна разлика ( $p>0,05$ ) у броју позитивних налаза антитела против LSDV у крвном и колостралном серуму крава ни са ELISA тестом ни са ВНТ. За разлику од резултата на Фарми 1, на Фарми 2 је већи број телади са позитивним налазом антитела против LSDV утврђен ELISA методом, него ВНТ. Такође је у првом термину узорковања код телади, односно 10 дана након рођења детектован највећи број телади са позитивним налазом антитела и то у 14 узорака (93,33%). У сваком наредном термину узорковања, број телади са позитивним налазом антитела се смањивао. Тако је 20 дана након рођења 14 узорака (93,33%) имало позитиван налаз ELISA методом, док је ВНТ 13 узорака (86,67%) имало позитиван налаз антитела против LSDV. 30 дана након рођења ELISA методом је утврђен позитиван налаз антитела код 13 телади (86,67%), а ВНТ код 10 телади (66,67%). У следећем термину узорковања, 45 дана након рођења, број телади са позитивним налазом антитела детектованих ELISA методом се незнатно смањило на 9 (60%), док се број телади са позитивним налазом детектованих ВНТ смањило више него дупло на 6 (40%). Број телади са позитивним налазом антитела наставља да се смањује, тако да је 60 дана након рођења ELISA методом утврђено присуство специфичних антитела у 6 узорака (40%), а ВНТ дупло мање у 3 (20%) узорка. ELISA методом је утврђено присуство специфичних антитела у 4 узорка (26,67%) 75 дана након рођења, док се у следећем термину узорковања 90 дана након рођења тај број смањило на 2 узорка (13,33%). Последњи позитиван налаз антитела детектован ВНТ је забележен 75 дана након рођења телади. За разлику од резултата са Фарме 1, где су и у последњим терминима узорковања бележени позитивни налази антитела код малог броја телади (1-3), на Фарми 2 у последња два термина узорковања, 105 и 120 дана након рођења није забележено ниједно теле са позитивним налазом антитела против LSDV.

Применом  $\chi^2$ -теста није установљена статистички значајна разлика ( $p>0,05$ ) у броју позитивних налаза антитела у узорцима крвних серума крава са Фарме 1 и Фарме 2 ни са ELISA тестом ни са ВНТ. У првом и другом термину узорковања, односно 10 и 20 дана након рођења, установљена је статистички значајна разлика

( $p < 0,05$ ) у броју позитивних налаза антитела у крвном серуму телaди са Фарме 1 и Фарме 2 утврђених ELISA тестом. Такође је и 30 дана након рођења установљена је статистички значајна разлика ( $p < 0,01$ ) у броју позитивних налаза антитела у крвном серуму телaди са Фарме 1 и Фарме 2 утврђених ELISA тестом. У осталим терминима испитивања (45, 60, 75, 90, 105 и 120 дана након рођења) није установљена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у броју позитивних налаза антитела у крвном серуму телaди са Фарме 1 и Фарме 2 утврђених ELISA тестом, док ни у једном термину испитивања није установљена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у броју позитивних налаза антитела у крвном серуму телaди са Фарме 1 и Фарме 2 утврђених ВНТ.

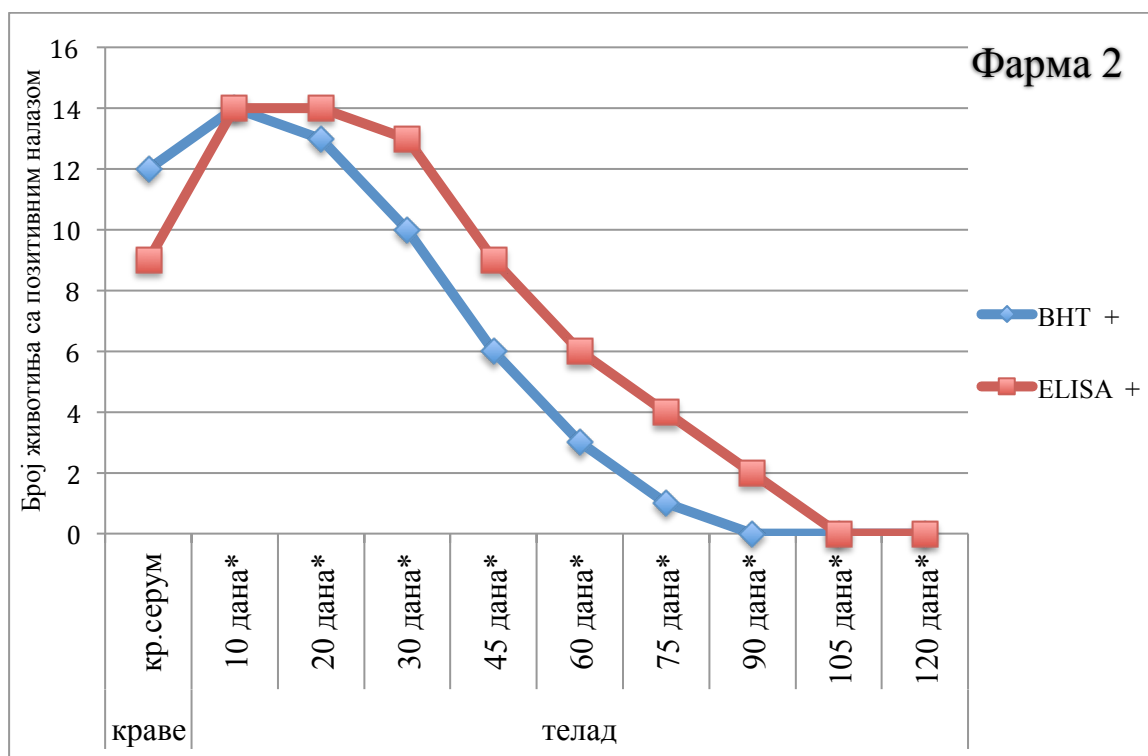
Ради бољег приказа, на Графиконима 6 и 7 су дати резултати упоредног испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телaди на Фармама 1 и 2 методама ELISA и ВНТ.

Графикон 6. Приказ упоредног испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телaди на Фарми 1 методама ELISA и ВНТ.



\*број дана након вакцинације

Графикон 7. Приказ упоредног испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади на Фарми 2 методама ELISA и ВНТ.



\*број дана након вакцинације

### 5.3.1. Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава и њихове телади ELISA методом

Ради бољег сагледавања динамике стварања, пасивног трансфера и детекције антитела против LSDV ELISA методом у узорцима крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвним серумима њихове телади у Табели 12 и Табели 13 су приказане добијене вредности S/P односа за сваку испитану краву и теле по терминима испитивања. У Табели 12 су приказани резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних серума крава и телади на Фарми 1.

Табела 12. Резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвих серума крава и телади на Фарми 1 – приказане су вредности S/P односа (%).

P. бр.	ELISA - Вредности S/P односа (%) – ТЕЛАД фарма 1									
	Крава-к.серум	10 дана*	20 дана*	30 дана*	45 дана*	60 дана*	75 дана*	90 дана*	105 дана*	120 дана*
1	191,61	262,82	247,79	241,49	235,18	155,88	124,39	108,68	67,03	74,38
2	7,93	35,79	41,97	21,17	16,81	4,28	2,14	4,45	0,00	2,38
3	22,23	3,78	0,93	4,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14	0,21	0,41
5	113,75	137,43	113,31	80,39	45,00	32,00	19,41	18,80	8,47	3,20
6	95,57	116,70	98,31	60,16	33,72	18,08	13,67	5,42	0,00	0,00
7	92,34	89,42	69,19	28,57	15,74	14,97	8,03	6,30	3,93	1,55
8	6,18	21,07	10,30	0,49	0,00	0,00	0,00	1,24	0,83	0,31
9	3,51	3,64	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00	1,76	0,72	0,93
10	244,56	5,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	85,33	59,41	44,37	25,27	9,33	1,26	3,04	0,00	3,51	3,31
12	199,45	22,83	12,93	1,55	0,00	0,00	0,00	1,65	0,41	0,62
13	229,98	343,49	234,21	195,53	158,99	150,43	76,03	67,67	34,92	14,77
14	134,41	117,59	66,47	40,52	31,56	19,09	16,94	9,81	2,07	1,55
15	221,00	307,61	288,06	265,79	231,97	260,74	221,69	187,53	182,54	143,90

\*број дана након вакцинације

Према резултатима са Фарме 1 приказаним у Табели 12 може се видети да је 10 крава било са позитивним налазом антитела против LSDV, док је у првом термину узорковања 10 дана након рођења позитиван налаз антитела имало 9 телади. Краве бр. 10 и 12 су имале високе вредности S/P односа (244,56% и 199,45%), међутим код њихове телади није утврђено присуство специфичних антитела у првом термину испитивања, као ни у било којем следећем. Такође теле бр. 2 је имало позитиван налаз антитела у прва два термина испитивања иако код његове мајке нису детектована антитела. Краве бр. 1, 5, 6, 7, 11, 13, 14 и 15 су имале позитиван налаз антитела против LSDV и код њихове телади је такође утврђено присуство специфичних антитела у најмање прва два термина испитивања. Телад бр. 2, 7 и 11 су имала позитивне налазе антитела само 10 и 20 дана након рођења, док су у свим наредним терминима узорковања налази били негативни. Телад број 6 и 14 су имала позитивне налазе антитела последњи пут 45 дана након рођења, а теле бр. 5, 60 дана након рођења. Теле

бр. 13 је последњи позитиван налаз антитела против вируса LSD имало 105 дана након рођења, док је код телад бр. 1 и 15 присуство специфичних антитела утврђено у свим терминима узорковања. Највише вредности S/P односа код свих телад су биле забележене у првим терминима узорковања, да би се са сваким наредним узорковањем и вредности S/P односа смањивале.

У Табели 13 су приказани резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних и мелчних серума крава и крвних серума телад на Фарми 2.

Табела 13. Резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних и колостралних серума крава и крвних серума телад на Фарми 2 – приказане су вредности S/P односа (%).

Р. бр.	S/P(%)		ELISA - Вредности S/P односа (%) – ТЕЛАД фарма 2								
	Крава	Колос.	10 дана*	20 дана*	30 дана*	45 дана*	60 дана*	75 дана*	90 дана*	105 дана*	120 дана*
1	62,91	197,00	91,11	69,85	46,75	29,24	22,35	17,58	2,13	0,00	0,00
2	0,00	7,33	0,00	0,00	0,00	0,72	0,31	0,47	0,59	0,00	0,00
3	53,47	228,51	230,15	210,30	165,29	134,09	80,27	49,88	25,70	4,69	2,15
4	216,81	226,65	112,69	95,34	70,14	53,0	16,32	15,61	9,15	0,82	0,00
5	0,00	0,93	142,41	145,01	120,31	67,05	26,17	24,41	12,21	1,88	0,00
6	200,76	312,40	114,48	134,86	63,45	47,42	36,38	37,68	17,84	0,00	0,00
7	177,66	275,52	99,13	70,82	78,99	38,02	18,78	12,44	8,57	0,23	0,00
8	23,36	183,57	265,29	233,30	256,92	133,68	81,46	90,49	61,15	7,04	3,87
9	16,16	124,69	212,04	184,92	99,18	75,31	91,31	45,54	36,15	9,51	5,02
10	18,22	155,68	95,23	49,35	29,46	12,19	12,09	1,76	0,00	0,00	0,00
11	13,02	163,33	168,22	73,55	59,71	23,97	15,14	6,92	5,28	1,17	0,00
12	156,51	339,67	138,39	55,05	40,60	20,87	15,49	7,16	1,88	0,47	0,00
13	200,11	224,59	182,43	188,38	87,71	8,99	4,69	2,23	0,00	0,00	0,00
14	74,51	261,88	157,59	148,36	119,01	57,75	41,20	21,83	7,39	3,64	1,08
15	41,76	147,00	151,19	137,44	130,37	55,87	31,15	20,54	6,10	1,61	0,32

\*број дана након вакцинације

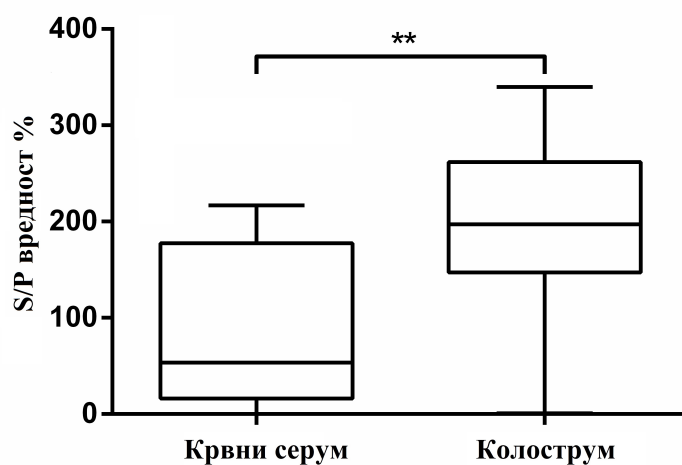
На Фарми 2, ELISA методом је утврђен позитиван налаз антитела против LSDV у 9 узорака крвних серума крава, док је у 13 узорака колостралних серума утврђен позитиван налаз. Код крава бр. 2 и 5 позитиван налаз није утврђен ни у

узорцима крвних ни колостралних серума и једино је код њих вредност S/P односа у узорцима крвних серума износила 0,00%. Код телета краве бр. 2 је потврђен негативан налаз антитела у свим терминима узорковања. Код телета краве бр. 5, која је такође имала негативан налаз антитела, присуство специфичних антитела је утврђено 10, 20, 30 и 45 дана након рођења, са вредностима S/P односа од 142,41% до 67,05%. Код крава бр. 8, 9, 10 и 11 су у узорцима крвних серума утврђене вредности S/P односа изнад 0,00%, али испод нивоа детекције (Cutt off) од 13,02% до 23,36%, па су детектоване S/P вредности у узорцима колостралних серума износиле од 124,69% до 183,57%. Код свих крава са позитивним налазом антитела, веће вредности S/P односа су детектоване у узорцима колостралних серума (од 124,69% до 312,40%), него у узорцима крвних серума (од 41,76% до 216,81%). За разлику од резултата на Фарми 1, на Фарми 2 је 10 дана након рођења чак 14 телади имало позитиван налаз антитела против LSDV. Теле бр. 10 је имало позитиван налаз антитела само у прва два термина узорковања, 10 и 20 дана након рођења. Телади бр. 1, 11, 12 и 13 су имала последњи позитиван налаз антитела 30 дана након рођења. У следећем термину узорковања, 45 дан након рођења, телади бр. 4, 5 и 7 су имала последњи позитиван налаз антитела. Последњи позитиван налаз антитела код телади бр. 14 и 15 је детектован 60 дана након рођења, а код телета бр. 8 и 9 75 дана након рођења. Уколико упоредимо резултате са Фарме 2 и Фарме 1, може се видети да на Фарми 2 ниједно теле није имало позитиван налаз у свим терминима узорковања, док су се антитела против LSDV најдуже могла детектовати у узорцима телади бр. 8 и 9, и то 90 дана након рођења. Исто као на Фарми 1, и на Фарми 2 су највише вредности S/P односа код свих телади биле забележене у првим терминима узорковања, да би се са сваким наредним узорковањем и вредности S/P односа смањивале.

Анализом вредности S/P односа утврђених ELISA методом применом Mann-Whitney U теста утврђен је статистички значајно већи ( $p < 0,01$ )\*\* ниво антитела у колостралном у односу на крвни серум крава на Фарми 2 (Графикон 8).

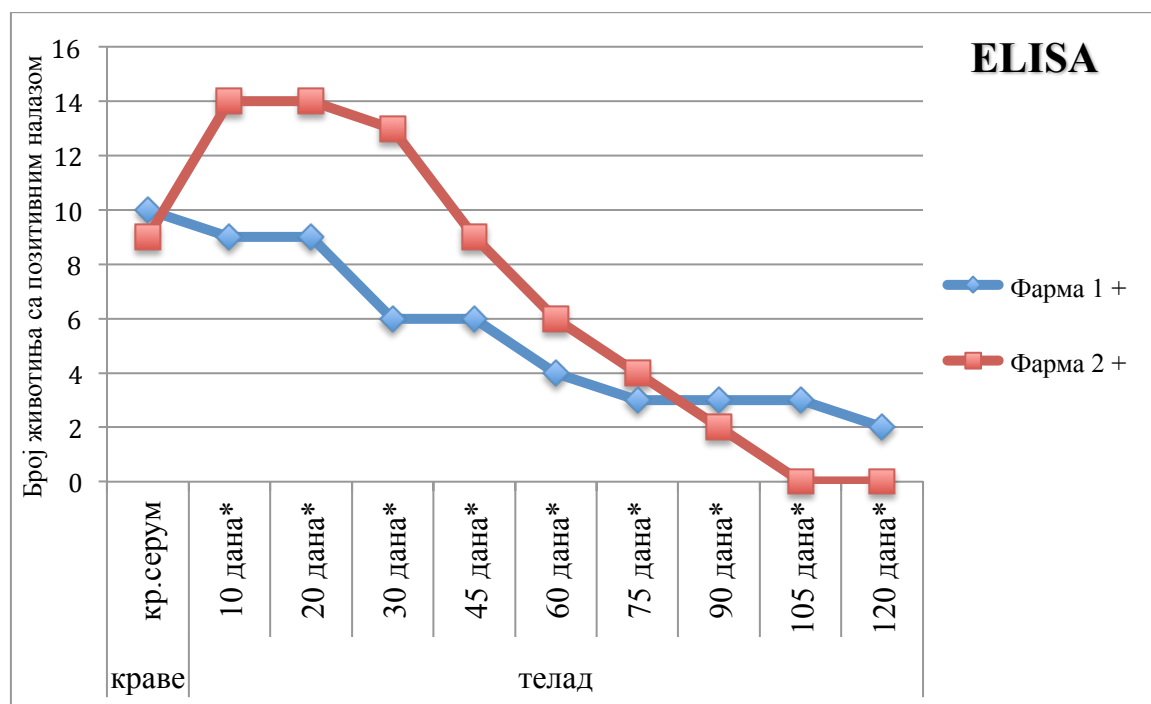


Графикон 8. Упоредни приказ вредности S/P односа у колостралном и крвном серуму крава на Фарми 2.



Графички приказ резултата испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телад на обе фарме ELISA методом дат је у Графикону 9.

Графикон 9. Приказ резултата испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телад на обе фарме ELISA методом.



\*Број дана након рођењ

### 5.3.2. Испитивање антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима вакцинисаних крава и њихове телади методом ВНТ

У табелама 14 и 15 су приказани резултати иситивања узорака крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвних серума њихове телади извршених ВНТ ради бољег сагледавања динамике стварања, пасивног трансфера и детекције антитела против LSDV. Резултати су приказани у вредностима титра антитела за сваку испитану краву и теле по термину узорковања. У табели 14 су приказани резултати испитивања узорака крви вакцинисаних крава и њихове телади са Фарме 1 вршених ВНТ.

Табела 14. Резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних серума крава и телади на Фарми 1 – приказане су вредности титра антитела ( $\log_2$ ).

Редни бр.	Титар ( $\log_2$ )	ВНТ – вредности титра антитела ( $\log_2$ ) – ТЕЛАД фарма 1								
	Крава-к.серум	10 дана*	20 дана*	30 дана*	45 дана*	60 дана*	75 дана*	90 дана*	105 дана*	120 дана*
1	5	6	6	5	2	2	2	1	1	0
2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0
6	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0
7	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0
8	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4	3	2	1	1	1	0	0	0	0
12	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
13	4	2	3	2	2	1	1	1	0	0
14	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
15	5	8	5	5	5	5	3	3	1	1

\*број дана након вакцинације

Испитивање крвних серума крава са Фарме 1 ВНТ је дало исте резултате као и ELISA методом, тако да је 10 истих крава имало позитиван налаз антитела (Табела 14). Титар антитела против LSDV у крвном серуму крава се кретао од  $2\log_2$  до  $6\log_2$ . Иако је крава бр. 12 имала висок титар антитела од  $6\log_2$ , њено теле ни у испитивању ВНТ није имало позитиван налаз ни у једном термину узорковања. У првом термину узорковања, 10 дана након рођења телаци, ВНТ су детектована два позитивна узорка више, односно укупно 11. Телад бр. 8 и 12 су имали позитиван налаз антитела против LSDV само и испитивању вршеном ВНТ. Међутим, крава бр. 8 је имала негативан налаз антитела, док је код краве бр. 12 налаз био позитиван обема методама. Присуство антитела код остале позитивне телаци се поклапао са позитивним налазом антитела у крвном серуму њихових мајки. Низак титар антитела од  $1\log_2$  је утврђен код телаци бр. 2, 8 и 12 која су била позитивна само 10 и 20 дана након рођења. Телад бр. 6 и 14 су била позитивна ВНТ и 30 дана након рођења, док су ELISA методом била позитивна и у наредном термину узорковања. ВНТ је утврђен последњи позитиван налаз антитела код телаци бр. 5 и 7 45 дана након рођења, док је ELISA методом теле бр. 5 било позитивно и 60 дана након рођења, а теле бр. 7 само 10 и 20 дана након рођења. Сличан случај се може видети код телета бр. 11 које је ВНТ било позитивно и 60 дана након рођења, а ELISA методом само у прва два термина узорковања. Теле бр. 13 је ВНТ имало последњи позитиван налаз антитела 90 дана након рођења, а ELISA методом и 105 дана након рођења. За разлику од ELISA методе, ВНТ није утврђен позитиван налаз антитела код телета бр. 1 и у последњем термину узорковања, већ само код телета бр. 15. Титар антитела код телаци је био највиши на почетку узорковања, а затим је постепено опадао, и што је титар антитела био већи на почетку, то су антитела остала дужи временски период на детектабилном нивоу. Титар антитела код телаци на Фарми 1 се кретао од  $1\log_2$  до  $8\log_2$ .

У табели 15 су приказани резултати испитивања узорака крвних и колостралних серума вакцинисаних крава и крвних серума њихове телаци са Фарме 2 вршених ВНТ.

Табела 15. Резултати испитивања присуства антитела против LSDV у узорцима крвних и колостралних серума крава и крвних серума телади на Фарми 2 – приказане су вредности титра антитела ( $\log_2$ ).

Р. бр.	Титар ( $\log_2$ )		ВНТ – вредности титра антитела ( $\log_2$ )– ТЕЈАД фарма 2								
	Крава		10	20	30	45	60	75	90	105	120
	к.серум	колас.	дана*	дана*	дана*	дана*	дана*	дана*	дана*	дана*	дана*
1	4	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	3	2	2	2	0	1	0	0	0	0
4	1	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	3	2	1	0	0	0	0	0
6	3	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0
7	4	6	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	0	2	3	3	3	2	0	1	0	0	0
9	3	4	3	2	1	1	1	0	0	0	0
10	3	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	2	4	3	2	3	1	0	0	0	0	0
12	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
13	3	5	3	3	2	0	0	0	0	0	0
14	1	4	3	2	2	1	2	0	0	0	0
15	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

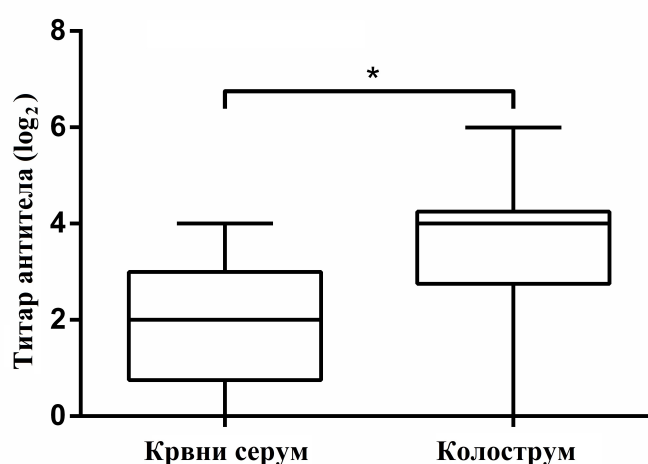
\*број дана након вакцинације

ВНТ је у крвним серумима крава са Фарме 2 утврђено 12 позитивних узорака на присуство антитела против LSDV, а у колостралним серумима 13 позитивних узорака. Када се ове вредности упореде са вредностима добијеним ELISA методом, види се да су краве бр. 2, 5 и 8 биле серолошки негативне у оба испитивања, док су краве бр. 9, 10 и 11 биле серолошки негативне ELISA методом, а позитивне ВНТ са титром антитела од  $2\log_2$  до  $3\log_2$ . Краве бр. 2 и 5 су имале негативан налаз антитела против LSDV ВНТ и у колостралном серуму, што се подудара са резултатима ELISA. У првом термину узорковања, 10 дана након рођења телади, позитиван налаз антитела је утврђен код 14 телади, с тим да је ВНТ негативан налаз антитела утврђен код телета бр. 15 у првом и свим наредним терминима узорковања, иако је његова мајка имала позитиван налаз антитела и у крвном и колостралном серуму, а само теле је ELISA методом било позитивно и 60 дана након рођења. Теле бр. 12 је било позитивно само

у првом термину узорковања, што се такође не поклапа са резултатима ELISA. Последњи позитиван налаз антитела код телади бр. 4 и 10 је утврђен 20 дана након рођења. И 30 дана након рођења телади већи број позитивних налаза је детектован ELISA методом (13), него ВНТ (10), а тако остаје све до краја узорковања. Телад бр. 6, 7 и 13 су последњи пут била позитивна 30 дана након рођења, док је теле бр. 3 било негативно у том термину, а позитивно у следећем. Последњи позитиван налаз антитела код телади бр. 1, 5, 11 је утврђен 45 дана након рођења. Свега три позитивна налаза антитела су забележена 60 дана након рођења код телади бр. 3, 9 и 11, док их је ELISA методом забележено 6. Последњи позитиван налаз антитела ВНТ је забележен код телета бр. 8 и то 75. дана након рођења, с тим да је теле бр. 8 у претходном термину узорковања имало негативно налаз антитела. Уколико упоредимо резултате са Фарме 1 и Фарме 2, може се видети да је ниједно теле са Фарме 2 није имало позитиван налаз антитела у свим терминима узорковања, па чак ни 105 дана након рођења. Такође су и вредности титра антитела код телади на Фарми 1 биле више, док су се на Фарми 2 кретале од  $1\log_2$  до  $3\log_2$ .

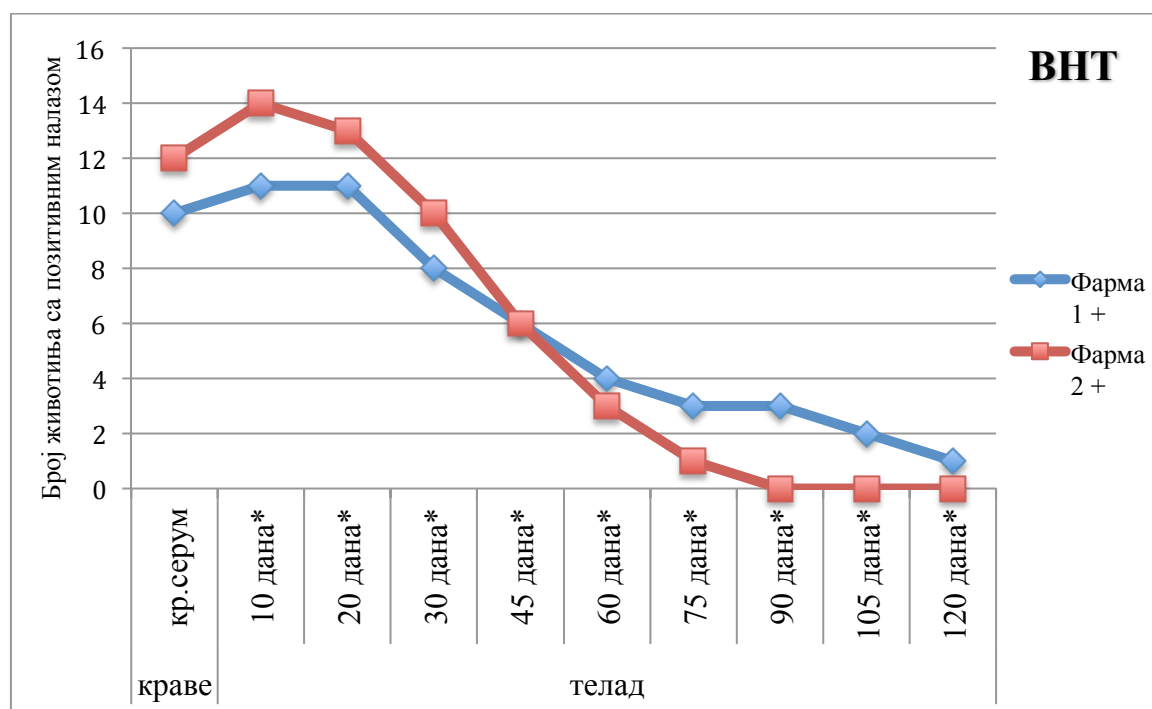
Анализом вредности титра антитела утврђених ВНТ применом Mann-Whitney U теста утврђен је статистички значајно већи ( $p < 0,05$ )\* ниво антитела у колостралном у односу на крвни серум крава на Фарми 2 (Графикон 10).

Графикон 10. Упоредни приказ вредности S/P односа у колостралном и крвном серуму крава на Фарми 2.



Графички приказ резултата испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади на обе фарме методом ВНТ дат је у Графикону 11.

Графикон 11. Приказ резултата испитивања крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади на обе фарме методом ВНТ.



\*Број дана након рођења

#### 5.4. УПОРЕДНО ИСПИТИВАЊЕ МЕТОДА ELISA И ВНТ ЗА ДЕТЕКЦИЈУ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ

За потребе израчунавања *каппа* теста и испитивање осетљивости и специфичности метода ELISA и ВНТ коришћени су резултати упоредног испитивања 125 узорака крвних серума из банке серума НИВ-НС пре појаве LSD у Републици Србији и 200 узорака крвних серума вакцинисаних крава против LSD. У Табели 16 је дат приказ резултата упоредног испитивања детекције антитела у узорцима крвних серума крава из банке серума НИВ-НС и вакцинисаних крава против LSDV методама ELISA и ВНТ коришћењем *каппа* теста.

Табела 16. *Kappa* статистика упоредног испитивања детекције антитела против LSDV у узорцима крвних серума крава из банке серума НИВ-НС и вакцинисаних крава методама ELISA и ВНТ

		ВНТ			<i>Kappa</i> коефицијент = 0,913
ELISA		+	-	Σ	Стандардна грешка <i>kappa</i> = 0,0285
	+	60	1	61	Укупна сагласност = 0,9723
	-	8	256	264	95% интервал поверења - доња граница = 0,8571
	Σ	68	257	325	95% интервал поверења - горња граница = 0,9689

Према приказаним резултатима се види да се резултати упоредних испитивања нису подударили само у 9 од 325 испитаних узорака. 8 узорака крвних серума вакцинисаних крава узоркованих 20, 30, 75 и 105 дана након вакцинације су били позитивни само ВНТ, док је један узорак крвног серума из банке серума био позитиван само ELISA тестом. Резултати 4 узорка узоркованих 20 дана након вакцинације се нису подударали, са титром антитела у ВНТ од  $\log_2 3$  до  $\log_2 4$ , а вредностима S/P односа од 9,07% до 21, 68%. Затим, резултати 2 узорка узоркована 30 дана након вакцинације се нису подударали, са титром антитела у ВНТ  $\log_2 4$ , а вредностима S/P односа 25, 07% и 25,33%. Исто се десило и у узорцима узоркованим 75 и 105 дана након вакцинације, где се резултати по једног узорка у оба термина, нису подударали, са титром антитела у ВНТ  $\log_2 1$ , а вредностима S/P односа 13,68% и 15,33%. На крају, у ELISA позитивном узорку из банке серума вредност S/P односа је 69,19%, док у ВНТ није детектовано присуство антитела у истом узорку.

Позитиван налаз антитела је ВНТ утврђен у 68 узорака, док је негативан налаз утврђен у 257 узорака. С друге стране, ELISA тестом је позитиван налаз антитела утврђен у 61 узорку, а негативан у 264 узорка. Вредност *kappa* коефицијента је износила 0,913, што представља скоро савршену сагласност поређених метода (Thrusfield, 2007).

Резултати ипитивања осетљивости и специфичности метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума из банке серума и вакцинисаних крава су приказани у Табели 17.

Табела 17. Израчунавање осетљивости и специфичности метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума из банке серума и вакцинисаних крава.

	ELISA **		ВНТ *	
	Позитивно	Негативно	Позитивно	Негативно
Позитивно	60 (СП)	8 (ЛН)	68 (СП)	0 (ЛН)
Негативно	1 (ЛП)	124 (СН)	0 (ЛП)	125 (СН)

СП стварно позитивно, ЛН лажно негативно, ЛП лажно позитивно, СН стварно негативно.

Специфичност:  $\text{СН}/(\text{СН}+\text{ЛП}) * 125/(125+0) = 100\%$ ;  $**124/(124+1) = 99,2\%$

Осетљивост:  $\text{СП}/(\text{СП}+\text{ЛН}) * 68/(68+0) = 100\%$ ;  $**60/(60+8) = 88,24\%$

За израчунавање специфичности ELISA и ВНТ коришћени су крвни серуми из банке серума НИВ-НС, зато што се могу сматрати сигурно негативним на налаз антитела против LSDV, јер у време узорковања тих узорака LSD није била присутна у Републици Србији. Према приказаним резултатима, специфичност ELISA теста је 99,2%, док је специфичност ВНТ 100%. С обзиром да се ВНТ сматра златним стандардом у дијагностици болести из рода CaV, израчуната је осетљивост ELISA теста у односу на ВНТ и износи 88,24%.

У Табели 18 је дат приказ резултата упоредног испитивања детекције антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади методама ELISA и ВНТ коришћењем *карпа* теста. Упоредно је испитано укупно 30 крвних серума вакцинисаних крава и 270 крвних серума телади са две фарме.



Табела 18. *Kappa* статистика упоредног испитивања детекције антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади методама ELISA и ВНТ

		ВНТ			<i>Kappa</i> коефицијент = 0,7239
ELISA		+	-	Σ	Стандардна грешка <i>kappa</i> = 0,0405
	+	102	24	126	Укупна сагласност = 0,8667
	-	16	158	174	95% интервал поверења - доња граница = 0,6445
	Σ	118	182	300	95% интервал поверења - горња граница = 0,8033

Према резултатима приказаним у Табели 18 може се видети да се резултати упоредног испитивања методама ELISA и ВНТ нису подарали у 40 од укупно 300 испитаних узорака крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади, односно у већем броју узорака у одосу на упоредно испитивање узорака из банке серума и вакцинисаних крава. Од укупно 40 узорака чији резултати се нису подударали, 14 узорака било је од телади пореклом са Фарме 1, док је 26 узорака било са Фарме 2, 3 узорка пореклом од крава и 23 узорка пореклом од телади. На Фарми 1 је 5 узорака било позитивно само ELISA тестом, док је 9 узорака било позитивно само ВНТ. Само ELISA тестом су била позитивна 2 узорка узоркована 60 дана након телења телади са граничним вредностима S/P односа 33,72% и 31,56%, и по један узорак узоркован 60 и 105 дана након рођења телади такође са граничним вредностима S/P односа од 32,00% и 34,92%. У последњем термину узорковања, 120 дана након рођења телади у једном узорку није детектовано присуство антитела ВНТ, док је ELISA тестом утврђена вредност S/P односа износила 74,38%. ВНТ је утврђено присуство антитела у по 2 узорка узоркована 10, 20, 30 и 40 дана након рођења телади и у једном узорку узоркованом 60 дана након рођења телади. Титар антитела у свим узорцима је износио  $\log_2 1$ , док су се вредности S/P односа кретале од 1,26% до 28,57%. На Фарми 2, 3 узорка крвних серума крава била су позитивна само ВНТ тестом са титром антитела  $\log_2 2$  до  $\log_2 3$ , док су вредности S/P односа у истим узорцима износиле од 13,02% до 18,22%. 4 узорка крвних серума телади било је позитивно само ВНТ, док је

19 узорака пореклом од телади било позитивно само ELISA тестом. По један узорак узоркован 10 и 20 дана након рођења телади, и два узорка узоркована 45 дана након рођења били су позитивни само ВНТ. Утврђени титар антитела у узорцима износио је  $\log_2 1$ , док су се вредности S/P односа кретале од 0,00% до 29,24%. У сваком термину узорковања од 10 до 90 дана након рођења телади било је по неколико узорака који су били позитивни само ELISA тестом са вредностима S/P односа од 31,15% до 151,19%. Највећи број узорака (5) који су били позитивни само ELISA тестом у једном термину узорковања било је 45 дана након рођења телади, чије су се вредности S/P односа кретале од 38,02% до 134,09%.

У узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади позитиван налаз антитела против LSDV је ВНТ утврђен у 118 узорака, док је негативан налаз утврђен у 182 узорака. У истим узорцима је ELISA тестом позитиван налаз антитела утврђен у 126 узорака, а негативан у 174 узорка. Вредност *kappa* коефицијента је износила 0,7239, што представља одличну сагласност поређених метода (Thrusfield, 2007).

ВНТ представља златни стандард у серолошкој дијагностици CaV-a. Резултати испитивања осетљивости и специфичности ELISA теста у односу на златни стандард ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове талади су приказани у Табели 19

Табела 19. Израчунавање осетљивости и специфичности ELISA теста у односу на ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади.

	ELISA **		ВНТ *	
	Позитивно	Негативно	Позитивно	Негативно
Позитивно	102(СП)	16(ЛН)	118 (СП)	0 (ЛН)
Негативно	24 (ЛП)	158 (СН)	0 (ЛП)	182 (СН)

СП стварно позитивно, ЛН лажно негативно, ЛП лажно позитивно, СН стварно негативно.

Специфичност:  $\text{СН}/(\text{СН}+\text{ЛП}) * 182/(182+0) = 100\%$ ;  $**158/(158+24) = 86,81\%$

Осетљивост:  $\text{СП}/(\text{СП}+\text{ЛН}) * 118/(118+0) = 100\%$ ;  $**102/(102+16) = 86,44\%$

Према резултатима приказаним у Табели 19 може се видети да је израчуната осетљивост ELISA теста у односу на ВНТ за детекцију антитела против LSDV у

узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади износила 86,44%, што је веома слично израчунатој осетљивости ELISA теста у односу на ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава (88, 24%). Специфичност ELISA теста у односу на ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади је износила 86,81%, што је ниже у односу на израчунату специфичност ELISA теста за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума из банке серума (99,2%).

У упоредном испитивању узорака крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади методама ELISA и ВНТ, већи број позитивних узорака утврђен је ELISA тестом. ВНТ представља најспецифичнију методу за детекцију антитела против LSDV, али такође мање осетљиву. На основу тога, израчунате су осетљивост и специфичност ВНТ у односу на ELISA тест за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади, које су износиле 80,95% и 90,80%. Утврђена специфичност ВНТ у односу на ELISA у упоредном испитивању узорака крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади је била већа, док је осетљивост ELISA теста била већа у односу на ВНТ у упоредном испитивању истих узорака. Резултати осетљивости и специфичности ВНТ у односу на ELISA тест за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади су приказани у Табели 20.

Табела 20. Израчунавање осетљивости и специфичности ВНТ у односу на ELISA тест за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади.

	ВНТ **		ELISA *	
	Позитивно	Негативно	Позитивно	Негативно
Позитивно	102(СП)	24(ЛН)	126 (СП)	0 (ЛН)
Негативно	16(ЛП)	158 (СН)	0 (ЛП)	174 (СН)

СП стварно позитивно, ЛН лажно негативно, ЛП лажно позитивно, СН стварно негативно.

Специфичност:  $СН/(СН+ЛП) * 174/(174+0) = 100\%$ ;  $**158/(158+16) = 90,80\%$

Осетљивост:  $СП/(СП+ЛН) * 126/(126+0) = 100\%$ ;  $**102/(102+24) = 80,95\%$

## 6. ДИСКУСИЈА

Болест квргаве коже је веома важна са економског аспекта, због великих губитака у говедарској производњи, нарочито код говеда, која претходно нису била изложене вирусу болести квргаве коже. Због значајног економског утицаја и брзине ширења болест се налази на листи болести обавезних за пријављивање Светској организацији за здравље животиња (*Office International des Epizooties - OIE*).

На територијама где се до недавно болест није појављивала, рано откривање болести зависи од знања и упућености ветеринара и фармера, као и од дијагностичких капацитета лабораторија. Вакцинација говеда живим атенуираним вакцинама представља најефикаснију меру контроле против болести квргаве коже. С обзиром на изостанак конзистентних серолошких резултата, поствакцинални мониторинг заснован искључиво на серолошким методама је за сада слаб показатељ ефикасности вакцинације (Turpurainen и сар., 2017). Брза потврда прелиминарне дијагнозе са терена је фундаментална за успех контроле и ерадикације болести квргаве коже. Од класичних вирусолошких метода користи се изолација вируса, а од молекуларних метода конвенционални или *real time PCR*. С друге стране, серолошки надзор након избијања болести је и даље проблематичан. Серолошки тестови су погодни за ретроспективна серолошка истраживања на нивоу запата, али нису довољно осетљиви да би се користили као примарни тестови за појединачно испитивање оболелих грла (EFSA, 2015). Вирус неутрализациони тест се сматра златним стандардом серолошке дијагностике CaV-a, веома је специфичан, али није довољно осетљив да детектује ниске нивое антитела код неких животиња након опоравка од природне инфекције (Kitching и Carn, 2008a; Kitching и Carn, 2008b). Телад рођена од вакцинисаних крава наслеђују пасивни имунитет, који презистира око шест месеци (Weiss, 1968). Међутим, у скорије време нису рађена истраживања на тему перзистенције матерналног имунитета против болести квргаве коже код телад (Turpurainen и сар., 2017).

Због локалног ширења вируса из ћелије у ћелију, ефекторске ћелије ћелијски посредованог имунолошког одговора, као NK (natural killer) ћелије или цитотоксични Т лимфоцити су неопходне за идентификацију и елиминацију инфицираних ћелија да би спречиле репликацију вируса и његово ширење (Seet и сар., 2003). Истраживања везана за *Orthopoxviruse* су показала да је неопходно заједничко деловање хуморалног

и целуларног имунолошког одговора за чишћење инфекције, док је за заштиту од реинфекције само деловање хуморалног имунитета довољно (Turpurainen и сар., 2017). Због недостатка комерцијалних дијагностичких тестова заснованих на ћелијски посредованом имунолошком одговору или тестова за испитивања квалитета производње вакцина (Turpurainen и сар., 2017), и чињенице да је улога антитела потврђена у неколико истраживања, где животиње нису имале детектабилан ниво антитела, али нису развиле инфекцију у контакту са вирулентим сојем вируса (Kitching, 1986b; Bowden и сар., 2009), веома је важно радити на унапређењу серолошке дијагностике LSD тренутно доступним комерцијалним тестовима као што су ELISA и ВНТ.

Сумња на појаву болести поставља се на основу карактеристичних клиничких симптома, док се коначна дијагноза поставља након добијања резултата лабораторијских испитивања. Брзи и поуздани лабораторијски тестови су неопходни, како за рано откривање болести и утврђивање статуса запата, тако и за праћење имунолошког статуса јединки након вакцинације, која је и даље најсигурнија мера у борби против ове болести. Ради спровођења ефикасних мера контроле против болести квргаве коже, као што су вакцинација и серолошки надзор запата, неопходно је добро испитати и разумети поствакцинални имунолошки одговор, како код одраслих јединки, тако и код телади.

У овом раду приказани су резултати упоредног испитивања антитела против вируса болести квргаве коже методама ELISA и модификованим и унапређеним ВНТ, као и резултати праћења поствакциналних антитела код крава и трансфера матерналног имунитета код телади, који ће омогућити боље разумевање имунолошког одговора код вакцинисаних говеда, пасивног хуморалног имунитета код телади, као и унапређење серолошке дијагностике ове значајне болести говеда.

## **6.1. МОДИФИКОВАНИ ВНТ**

За испитивање узорака крвних серума из банке серума НИВ-НС, крвних серума вакцинисаних крава, млечних серума крава и крвних серума телади коришћен је модификовани вирус неутрализациони тест. Модификација ВНТ у односу на препоручени ВНТ од стране ОИЕ (ОИЕ, 2016) се односила на коришћени вирус,

културу ћелија и временско трајање теста. У овом истраживању је ВНТ извођен коришћењем хомологног вируса SERBIA/Бујановац/2016 који је изолован на MDBK култури ћелија из кожных промена клинички оболеле животиње (Торлак и сар., 2017). С друге стране, за извођење ВНТ ОИЕ препоручује коришћење CaV-a (вакцинални сој) (ОИЕ, 2016). Већина аутора до сада је користила вакцинални сој CaV-a за извођење ВНТ (Babiuk и сар., 2009а; Tilahun и сар., 2014; Milovanović и сар., 2019). Добро умножавање изолованог вируса на MDBK култури ћелија, са развојем јасно уочљивог ЦПЕ омогућило је да се време трајања теста од препоручених 9 дана смањи на 3 дана (ОИЕ, 2016). У истраживању које су спровели Awad и сар., 2010, изолација вируса је вршена на MDBK култури ћелија. Након појаве ЦПЕ вирус је идентификован имунофлуоресцентном техником. Изолација вируса на MDBK култури ћелија се показала корисна када су као узорци доступни промењени делови коже говеда (Awad и сар., 2010; Vidanović и сар., 2016; Bedeković и сар., 2017). ОИЕ такође препоручује процедуру ВНТ за израчунавање неутрализационог индекса (праве се разређења вируса, а користи константна количина серума). Недостатак ове методе је што је за њено извођење потребна велика количина серума. Процедура ВНТ за израчунавање титра антитела (праве се разређења серума, а користи константна количина вируса) се такође показала ефикасна, јер између резултата добијених коришћењем ове две методе није утврђена статистички значајна разлика (Hamidouche и сар., 2018). Према томе, модификовани ВНТ има предност у односу на препоручени ВНТ од стране ОИЕ и велики потенцијал у серолошкој дијагностици LSD (Samojlović и сар., 2019).

## **6.2. ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ У УЗОРЦИМА КРВНИХ СЕРУМА ИЗ БАНКЕ СЕРУМА И НАУЧНОГ ИНСТИТУТА ЗА ВЕТЕРИНАРСТВО "НОВИ САД" И ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА**

Испитивање присуства антитела против LSDV вршено је у узорцима крвних серума говеда која никад нису била у контакту са LSDV (банка серума), као и у узорцима крвних серума вакцинисаних крава. У узорцима из банке серума (Јужнобачки и Сремски округ) установљен је један позитиван налаз (0,8%) и то применом ELISA методе, док је применом ВНТ није установљен ниједан позитиван

налаз. Слични резултати се могу наћи и у истраживању других аутора. Bowden и сар, 2009, су вршили испитивање специфичности детекције антитела против CaV-a ELISA методом у крвним серумима говеда, оваца и коза из Аустралије које никад нису биле у контакту са вирусом. Позитиван налаз антитела је утврђен у 5% узорака крвних серума говеда, 5,3% узорака крвних серума оваца и 4,9% крвних серума коза. С обзиром да ELISA методом није било могуће утврдити присуство антитела против вирусна заразне ектиме, одбачена је могућност укрштене реакције са *Parapoxvirusima*, већ су аутори закључили да је позитиван налаз антитела код животиња из Аустралије резултат неке друге недефинисане неспецифичне реакције, што је вероватно случај и у нашем истраживању. Лажно позитивни резултати су били присутни у испитивању узорака крвних серума говеда ван ендемских области ELISA тестом, када је утврђено 3,64% узорака са позитивним налазом антитела против LSDV (Carn и сар., 1994).

У узорцима крвних серума вакцинисаних крава праћена је динамика стварања, трајање и могућност детекције антитела против LSDV. За детекцију антитела против LSDV коришћене су серолошке методе дијагностике, комерцијални ELISA тест и модификовани ВНТ. Први позитивни налази антитела против LSDV су се јавили 20 након вакцинације крава. Највећи број животиња са позитивним налазом антитела против LSDV је утврђен 30 дана након вакцинације. Ови налази су у складу са резултатима истраживања других аутора. Највећа сероконверзија се јавила 30 дана након вакцинације, а прво присуство антитела је могуће утврдити 20 дана након вакцинације (Hunter и Wallace, 2001; Tilahun и сар., 2014; Turpurainen и сар., 2017; Abd-Elfatah и сар., 2019). У нашем истраживању се након 30 дана број животиња са позитивним налазом смањило за 50% и на том или сличном нивоу се задржао све до 120 дана након вакцинације. Сем у другом термину узорковања, 20 дана након вакцинације, када је ELISA тестом утврђено 2 позитивна налаза, а ВНТ 6 позитивних налаза антитела против LSDV, ни у једном другом термину узорковања није било значајних разлика у броју позитивних налаза утврђених ELISA тестом и ВНТ. Упоредним испитивањем истих узорака аутори су закључили да су ВНТ и ELISA у доброј корелацији у раним фазама сероконверзије, иако је постојао мањи број узорака чији резултати се нису подударали (Babiuk и сар., 2009a). Abd-Elfatah и сар., 2019 су пратили вакцинисане овце и козе против CaV-a и највише OD вредности ELISA тестом утврдили 10 дана након вакцинације, док је највиши ниво неутрализационих антитела забележен 4 недеље након вакцинације. Turpurainen и сар., 2017, такође

наводе да се после 30. дана ниво антитела смањује испод нивоа детекције. Животиње са слабо израженим клиничким симптомима или вакцинисане животиње често развијају низак ниво антитела који се не може детектовати доступним серолошким тестовима, али то не значи да нису заштићене. Код природно инфицираних животиња присуство антитела против CaV-a се може обично утврдити 3 до 6 месеци после инфекције (Turpurainen и сар., 2017). У истраживању спроведеном у Етиопији, где се LSD ендемски јавља, на годишње вакцинисаним кравама, узорковање је вршено на дан вакцинације, 7, 14, 21, 35 и 63 дана након вакцинације. Утврђено је присуство антитела и 7 дана након вакцинације. Код већине крава, сероконверзија је детектована 21 дан након вакцинације, док је највиши ниво антитела утврђен 35 дана након вакцинације код свих испитиваних крава (Tilahun и сар., 2014; Varshovi и сар., 2018; Nogian и сар., 2019). Од 21 дан након вакцинације већина крава је имала титар антитела једнак или већи од 1:25. Антитела на високом нивоу детекције ВНТ су се одржала до 63 дана након редовне годишње вакцинације. Иначе, код већине редовно вакцинисаних крава није било могуће утврдити присуство антитела пре почетка истраживања, што показује да је трајање детекатбилног хуморалног имунолошког одговора мање од годину дана. Само је 13,3% испитаних крава имало титар антитела  $\geq 1:25$  пре вакцинације. Аутори су такође уочили да је сероконверзија на две фарме је била различита због менаџмента и расног састава, односно због различитог процента заступљености егзотичних гена код животиња на фарми. Већа сероконверзија је запажена на фарми говеда на којој је био нижи проценат заступљености егзотичних гена (Tilahun и сар., 2014). Живе атенуиране GPV и RSPV вакцине, су се показале као погодне за контролу LSD, јер код телади доводе до стварања високог титра антитела, као и интензивне пролиферације лимфоцита и INF- $\gamma$  и IL-4, док се тровалентна вакцина (KSPP 0108, RSSP, Held GTP) због истих карактеристика препоручује за вакцинације говеда против LSDV (Khafagy и сар., 2016; Varshovi и сар., 2018; Abd-Elfatah и сар., 2019). С друге стране, Abutarbush и Turpurainen, 2018, су показали да Yugoslavian RM65 вакцина против вируса богиња оваца доводи до сероконверзије код 11 од 17 тестираних говеда, али уколико се примени у десетострукој дози у односу на овце, и тада доводи и до појаве нежељених ефеката (грозница, промене на кожи, пад млечности и конверзије хране). Истраживања су показала да титар антитела од 1:25 има заштитно дејство уколико се животиње изложе вирулентном соју LSDV (OIE, 2016; Garí и сар., 2010). У нашем истраживању је такође утврђено стварање антитела 20 дана након вакцинације, док је највећи број животиња са позитивним налазом



антитела утврђен 30 дана након вакцинације. Такође је у нашем истраживању 90, 105 и 120 дана након вакцинације утврђен већи број животиња са позитивним налазом антитела у односу на претходне термине узорковања, што може имати везе са чињеницом да је узорковање рађено код различитих животиња, које су имале различите зоохигијенске услове држања и биле различитог расног састава и узраста. Слична истраживања су рађена код коза, након вакцинације са вакцином против вируса богиња коза, праћен је имунолошки одговор вакцинисаних животиња. Резултати су показали да је 21 дан након вакцинације већина коза са фарме имала титар неутрализационих антитела од 1:16, док је неколико коза са индивидуалних газдинстава имало титар од 1:8. Највиши ниво титра антитела од 1:64 код коза са фарме достигнут је 3 месеца након вакцинације и на том нивоу се задржао до једне године након вакцинације. Код неколико коза са индивидуалних газдинстава највиши титар антитела од 1:32 је такође достигнут три месеца након вакцинације и задржао се на том нивоу до годину дана након вакцинације. У истом истраживању је показано да је титар антитела од 1:32 имао заштитно дејство приликом излагања коза вирулентном соју вируса, јер ниједна изложена коза није развила клиничку слику болести. Аутори објашњавају да је слабији имунолошки одговор код коза са индивидуалних газдинстава могао бити резултат нутритивног стреса, односно неизбалансираног оброка, у односу на животиње са фарме чији су оброци избачансирани (Barman, 2010).

Након вакцинације телади Neethling, KSGP и Gorgon вакцином праћена је сероконверзија IFAT (indirect fluorescent antibody test) тестом. Једино је након вакцинације Gorgon вакцином утврђен имунолошки одговор, и то 15 дана након вакцинације код 20% телади. Иако је само код 50% телади утврђен имунолошки одговор 25 дана након вакцинације Gorgon вакцином, сва говеда су била заштићена након излагања CaV-у. Немогућност детекције антитела након вакцинације теладу Neethling и KSGP вакцином указује на то да атенуирани вирус не изазива исти интензитет имунолошког одговора као вирулентни вирус који се интензивно умножава у организму. То је и потврђено три недеље након излагања телади теренској соју CaV-а, када је 80% телади имало детектабилан серолошки одговор (Gari и сар., 2015). Немогућност детекције антитела против CaV-а код свих животиња након вакцинације са невирулентним изолатима представља значајан проблем, јер је и ниво антитела код субклинички инфицираних животиња такође недовољно висок да би био утврђен применом доступних серолошких тестова (Babiuk и сар., 2009a). Awad и сар, 2010, су у свом истраживању показали да се низак ниво детекције антитела јавља код

животиња са слабо израженом клиничком сликом. Атенуирана KS-1 вакцина не доводи увек до стварања детектабилног нивоа антитела код коза, оваца и говеда, иако су животиње биле заштићене приликом излагања вирулентном соју вируса (Bowden и сар, 2009). Овца која је пасивно имунизована серумом заражене овце са CaV-ом, била је заштићена након излагања CaV-у, чиме је потврђена улога антитела у заштити организма од овог вируса (Kitching, 1986b).

Антитела против LSDV смо детектовали код 75% крава ВНТ, а док смо ELISA тестом детектовали антитела код 65% крава 30 дана након вакцинације. Титар антитела се кретао од 1:8 до 1:64. У последњем термину узорковања, 120 дан након вакцинације антитела смо детектовали код 40% крава обема методама. Титар антитела се кретао од 1:2 до 1:128. Око десет месеци (46 до 47 недеља) након вакцинације *OBP Lumpy skin disease* вакцином, ВНТ је било могуће детектовати антитела против LSDV код 34,18% говеда, а ELISA тестом код 32,91% говеда. Месец дана након ревакцинације истих говеда *Bovivax LSD-N* вакцином највећи број позитивних налаза је утврђен управо након месец дана, када је ВНТ тестом утврђено 75,95% позитивних, а ELISA тестом чак 96,2%. Након тога број животиња са позитивним налазом антитела почиње да се смањује, тако да је 5 месеци након ревакцинације позитивно 56,76% говеда ВНТ, а ELISA тестом 70,27%. Титар антитела у свим терминима узорковања се кретао од 1:10 до 1:300. (Milovanović и сар., 2019). Већи број позитивних налаза у овом испитивању у односу на наше истраживање се свакако може објаснити чињеницом да је имунолошки одговор говеда јачи и перзистира дужи временски период након ревакцинације у односу на примо-вакцинацију. Процена хуморалног имунолошког одговора код пет телади вакцинисаних против LSDV некомерцијалном вакцином (Ismailia сој) базирана је на вредностима титра антитела утврђеним методама ВНТ и ELISA. Резултати добијени ВНТ су одговарали резултатима добијеним ELISA тестом. Антитела су достигла заштитни ниво две недеље након вакцинације, док је највиши ниво антитела утврђен 12 недеља након вакцинације. Након тога ниво антитела се постепено смањује и опет достиже гранични-заштитни ниво 40 недеља након вакцинације (Abdelwahab и сар., 2016). Иста група аутора је испитивала имунолошки одговор код телади након вакцинације са вакцином против вируса богиња оваца (Romanian сој). Присуство антитела праћено је ELISA тестом и ВНТ, који су и у овом испитивању показали добру сагласност резулата. Антитела су достигла заштитни ниво три недеље након вакцинације, док је највиши ниво антитела утврђен 12 недеља након вакцинације. Након тога ниво

антитела се постепено смањује и опет достиже гранични-заштитни ниво 28 недеља након вакцинације (Khafagy и сар., 2016). OIE (2018; OIE 2017b) наводи да се неутрализациони индекс  $\geq 1,5$  сматра позитивним у ВНТ. У нашем истраживању 20 дана након вакцинације титар неутрализационих антитела је износио од 1:8 до 1:32, док је 45 дана након вакцинације износио од 1:32 до 1:64. У последњем термину узорковања, 120 дана након вакцинације титар неутрализационих антитела је износио од 1:2 до 1:128. Што се тиче вредности S/P односа у поменутим терминима, 20 дана након вакцинације је износио 50,57%-63,80%, 45 дана након вакцинације 120,98%-147,66%, а у последњем термину узорковања 42,39%-270,19%. Имунолошки статус вакцинисане или инфициране животиње није сразмеран нивоу неутрализационих антитела у серуму (Weiss, 1968; Kitching, 1986a). Највиши ниво антитела у нашем истраживању је утврђен 45 дана (око шест недеља) након вакцинације и вредности титра натитела су износиле од 1:32-1:64, док су 60 дана након вакцинације вредности титра антитела износиле 1:16 до 1:32. Након природне инфекције говеда LSDV присуство неутрализационих антитела је утврђено код 80% два дана након појаве симптома (што обухвата период инкубације вируса плус два дана). Седам дана након појаве симптома болести, неутрализациона антитела су утврђена код свих тестираних говеда. Титар антитела се кретао од 1:4 до 1:8. Антитела су достигла највиши ниво од 21 до 42 дана након појаве клиничких симптома са вредностима титра антитела од 1:17 до 1:25. Вредности титра антитела од 84 до 210 дана након појаве симптома су се кретале од 1:19 до 1:18. Антитела је било могуће утврдити све 210 дана након појаве симптома болести, односно токо седам месеци (Agag и сар., 1992). Након вакцинације седам оваца и коза са живом атенуираном Кепуан вакцином против вируса богиња оваца и коза, ниски нивои антитела су детектовани ELISA методом код једне овце између 14 и 28 дана након вакцинације, и само код једне козе 10 дана након вакцинације. За разлику од тих налаза, неутрализациона антитела су утврђена само код једне козе и то 43 дана након вакцинације (Bowden и сар., 2009). Код оваца и коза експериментлно инфицираних вирулентним CaV изолатима сероконверзија је детектована ELISA тестом између 14 и 21 дах након инфекције, што се подударало и са појавом неутрализујућих антитела. Између 21 и 63 дана након инфекције, антитела је било могуће утврдити код свих инфицираних животиња. Такође су аутори закључили да је ниво антитела био у корелацији са морбидитетом, односно да је виши ниво позитивних вредности и неутрализационог титра антитела утврђен код коза, које су све развиле клиничку слику болести (Bowden и сар., 2008, Babiuk и сар., 2009b). За

разлику од коза, од три експериментално инфициране овце са благом клиничком сликом болести (Babiuk и сар., 2009b), само је једна развила детектабилан ниво антитела ELISA тестом, и то између 21 и 35 дан након инфекције, док је низак ниво неутрализујућих антитела био присутан код све три животиње током тог периода. Аутори су закључили да ELISA тестом није било могуће поуздано утврдити присуство антитела након вакцинације коза и оваца, као ни код животиња које су након тога биле изложене вирулентном соју вируса богиња оваца и коза. Код вакцинисаних оваца и коза појава изражене реакције преосетљивости одложеног типа у дермису након инокулације вируса, заједно са снажном заштитом, коју пружа вакцина у одсуству детектабилног хуморалног имунолошког одговора, указује да је ћелијски посредован имунитет доминантан код ових животиња (Bowden и сар., 2009). Rao и Negi, 1997, наводе да ELISA тест у серолошкој дијагностици богиња оваца и коза често доводи до неспецифичних реакција и тиме омета тачну интерпретацију резултата. Испитивали су два експериментално инфицирана телета која су развила неутрализациона антитела 21 дан након инфекције, док су ELISA методом утврдили присуство антитела само код једног телета. Шта више, антитела су ELISA методом била детектабилна само од 21 до 35 дана након ифекције, док су се ВНТ антитела могла утврдити од 28 до 42 дана након инфекције (Bowden и сар., 2009). Утврђивање антитела против LSDV рађено је и индиректном ELISA методом (iELISA) код 25 клинички оболелих крава, 9 крава са појавом грознице и 21 краве које су биле у контакту са оболелим кравама. Присуство антитела је iELISA потврђено код 56% клинички оболелих крава, 11,11% крава са појавом грознице. Ниједна крава која је била у контакту са оболелим крава није имала антитела против LSDV (Awad и сар., 2010). Резултати су у складу са резултатима наших истраживања, где смо код вакцинисаних крава у различитим терминима узорковања након вакцинације ELISA тестом утврдили присуство антитела у 60 узорак, док смо ВНТ присуство антитела утврдили у 68 узорак.

### **6.3. ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ У УЗОРЦИМА КРВНИХ И КОЛОСТРАЛНИХ СЕРУМА ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА И КРВНИХ СЕРУМА ЊИХОВЕ ТЕЛАДИ**

У нашем истраживању вршено је испитивање присуства антитела против вируса болести квргаве коже методама ELISA и ВНТ у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове теледи на две фарме, док је на Фарми 2 испитивање присуства антитела против вируса болести квргаве коже вршено и у узорцима колостралних серума вакцинисаних крава. Доказана је сероконверзија код крава на дан партуса, као и трансфер матерналних антитела код њихове теледи у различитим временским интервалима након рођења. На Фарми 1 је већи број позитивних налаза антитела против LSDV код крава и теледи детектован ВНТ, док је на Фарми 2 већи број позитивних налаза антитела детектован ELISA тестом. На обе фарме је вакцинација крава вршена у месецу августу 2018. године, док су се на Фарми 1 краве телиле у месецу септембру 2018. године, а на Фарми 2 у месецу јануару 2019. године. Разлике у броју позитивних налаза антитела различитим методама на две фарме може бити последица временске разлике која је прошла од датума вакцинације до датума телења, као и чињенице да се различитим серолошким тестовима детектују различите врсте антитела. У сличном истраживању трансфера колостралних антитела, већи број позитивних налаза антитела против LSDV је такође детектован ВНТ у узорцима крвних серума крава и њихове теледи (Milovanović и сар., 2019). Такође је значајно истаћи да је код више од половине испитаних вакцинисаних крава постигнут висок ниво антитела против вируса болести квргаве коже (22/30). Сходно томе и пасивни трансфер антитела је потврђен код скоро свих испитаних теледи (24/30) 10 дана након рођења. Чињеница да код три телета која су узела колострум није утврђено присуство антитела ни у једном термину узорковања након рођења се може објаснити да ни код њихових мајки није утврђено присуство антитела нити у колоструму нити у крвном серуму ни једном од коришћених метода ELISA и ВНТ. Недостатак детектабилне пасивне заштите код једног телета упркос високом нивоу антитела утврђеном у крвном серуму његове мајке, такође може потврдити чињеницу да не обезбеђују све краве колострум једнаког квалитета (Furman-Fratczak и сар., 2011). Појава позитивних налаза антитела против LSDV код крава и негативних налаза антитела код њихове теледи забележена је и у истраживањима других аутора (Agianniotaki и сар., 2018;

Milovanović и сар., 2019). С друге стране, код пет телади је утврђен позитиван налаз антитела против LSDV у крвном серуму, иако код њихових мајки није, што се свакако објашњава да је количина антитела у крвном серуму крава нижа у односу на количину антитела присутних у колоструму (Larson, 1992; Baumrucker и сар., 2016, Milovanović и сар., 2019). Трансфер имуноглобулина класе G (IgG) се врши путем колострума, а уједно су имуноглобулини G класе одговорни за неутрализацију вируса путем везивања за патогени агенс и индукцију хуморалног имунолошког одговора (Atkinson и сар., 2000). У литератури се наводе следећи фактори који могу утицати на пасивни трансфер антитела код телади: време узимања колострума, метод и количина давања колострума, концентрација имуноглобулина у колоструму (>50mg/ml), микробиолошке карактеристике колострума и старост краве. Најефикаснија пасивна заштита се обезбеђује ако теле унесе одговарајућу количину колострума (2-4l) у року од 24 сата након рођења, док краве од треће лактације и више имају већу концентрацију имуноглобулина у колоструму од крава у првој и другој лактацији (Weaver и сар., 2000; Godden, 2008; Santos и сар., 2017). Теренско истраживање је показало да 3 од 30 тестираних крава није достигло сероконверзију након вакцинације против вируса LSD, иако су биле отпорне на накнадну инфекцију вирусом. Једна од три краве није успела да пружи пасивну имунизацију свом телету, које је угинуло због инфекције LSDV у узрасту од 2 недеље, због недостатка матерналних антитела (Hunter и Wallace, 2001). Код три телета антитела против LSDV утврђена су само ВНТ, док су резултати ELISA теста били негативни. Иста ситуација се десила и код три краве, код којих су антитела детектована само ВНТ. Код краве бр. 15 са Фарме 2, антитела су ВНТ и ELISA тестом утврђена у крвном и колостралном серуму, док у крвном серуму њеног телета антитела није било могуће детектовати ВНТ, иако су ELISA тестом детектована антитела са високим вредностима S/P односа (31,15% до 151, 19%) од 10 до 60 дана након рођења. Milovanović и сар. 2019, су такође пратили присуство антитела против LSDV код крава и матерналних антитела код њихове телади различитим серолошким методама и утврдили да у свим узорцима није могуће детектовати присуство антитела са све три методе (ВНТ, ELISA, IFAT). Највећи број телади са позитивним налазом антитела против LSDV обема коришћеним метода ELISA и ВНТ је утврђен 10, 20 и 30 дана након рођења, док након тога број телади са позитивним налазом антитела нагло опада. На Фарми 2, после 90 дана након рођења телади није било могуће утврдити ниједно теле са позитивним налазом, док су на Фарми 1 у последњем термину узорковања 120 дана након рођења телади утврђена

свега два позитивна налаза антитела ELISA тестом. Титар антитела код телади се кретао од 1:2 до 1:256, у просеку 1:4, а вредност S/P односа од 31,15% до 343,49%, у просеку 119,83%. Ови резултати су у складу са резултатима других аутора, где је трећина тестиране телади имала позитиван налаз матерналних антитела против LSDV 90 дана након рођења, док 120 дана након рођења ниједно теле није имало позитиван налаз. Због недостатака литературних података и чињенице да је за одбрану од LSDV неопходно дејство хуморалног и ћелијски-посредованог имунитета, титар антитела који има заштитно дејство још увек није утврђен (Agianniotaki и сар., 2018). Код три телета пореклом од крава вакцинисаних против LSDV (Ismalian сој вакциналног вируса) у току гравидитета праћен је ниво антитела против LSDV методама ELISA и ВНТ од прве недеље до шест месеци након рођења. Највиши ниво антитела утврђен је управо седам дана након телења телади обема коришћеним методама, док је у свим следећим терминима узорковања ниво антитела постепено опадао. Аутори наводе да су матернална антитела утврђена ВНТ и ELISA тестом перзистирала на заштитном нивоу у трајању од 16 недеља (Abdelwahab и сар., 2016). Слично истраживање је рађено код јагњади и јаради, када је праћено присуство трансфера неутрализационих антитела након вакцинације њихових мајки у гравидитету са тровалентном вакцином против вируса богиња оваца и коза (KSPP 0108, RSSP, Held GTP) и моновалентном вакцином против вируса богиња оваца (RSPPV). Антитела на заштитном нивоу су детектована 7 дана након рођења јагњади и јаради. У групи јагњади и јаради чије су мајке вакцинисане тровалентном вакцином, антитела су се на заштитном нивоу задржала до 10 недеља након рођења, док у групи јаради и јагњади чије су мајке вакцинисане моновалентном вакцином, заштитни ниво антитела било је могуће детектовати до 4-6 недеља након рођења. Још увек није утврђено да ли су циркулишућа антитела ниског титра довољна да утичу на одговор имуног система на вакцинацију (Abd-Elfatah и сар., 2019). Vitour и сарадници, 2011, су пратили присуство матерналних антитела против вируса плавог језика методама ELISA и ВНТ код 22 телета од вакцинисаних мајки и код све 22 јединке су утврдили позитиван налаз у узрасту од 30-60 дана након рођења обема методама. Утврдили су и средње време након рођења када телад постају серонегативна које је ELISA тестом износило 112 дана, а ВНТ 84 дана (Vitour и сар., 2011). Заштитно дејство неутрализационих антитела од 100% доказано је код јагњади пореклом од вакцинисаних оваца против SPV, изложених SPV током 4 недеље након рођења (Gulyaz, 1999).

Већи број позитивних налаза антитела у колоструму крава, него у крвном серуму потврђује чињеницу високе концентрације антитела у колоструму, која не могу увек да се утврде у серуму. На Фарми 2 смо ELISA тестом и ВНТ утврдили позитиван налаз антитела у колоструму код 13 крава, док је у крвном серуму ELISA тестом утврђен позитиван налаз код 9, а ВНТ код 12 крава, од укупно 15 тестираних. Титар антитела утврђен ВНТ у колоструму крава се кретао од од  $\log_2 2$  до  $\log_2 6$  ( од 1:4 до 1:64), док се у крвном серуму кретао од од  $\log_2 1$  до  $\log_2 4$  (од 1:2 до 1:16). Уколико упоредимо наше резултате са резултатима које су добили Agianniotaki и сар., 2018, такође можемо видети да је у колоструму вакцинисаних крава утврђен већи број позитивних налаза антитела против LSDV 18/19, него у крвном серуму крава 13/19. Узорке су испитивали ВНТ у петоструким серијским разређењима, тако да се титар антитела у колоструму крава кретао од 1:60 до 1:640, док је у крвном серуму био нешто нижи од 1:10 до 1:480. Процес колострогенезе се одиграва неколико недеља пре партуса, који има за циљ синтезу секрета богатог имуноглобулинима G класе (IgG1), док у крвном серуму може доћи до пада концентрације IgG1 (Baumrucker и сар., 2016). То објашњава већи број позитивних налаза антитела против LSDV у колоструму вакцинисаних крава, него у крвном серуму.

Телад рођена од вакцинисаних крава наслеђују пасивни имунитет, који презистира око шест месеци (Weiss, 1968). У нашем истраживању највећи број телаци са позитивним налазом антитела против LSDV и ELISA тестом и ВНТ забележен је 10 и 20 дана након рођења телаци на обе фарме. 75 дана након рођења телаци број телаци са позитивним налазом антитела је значајно смањен и износи свега 3 на Фарми 1, односно 4 на Фарми 2. На Фарми 1 присуство антитела 105 и 120 дана након рођења телаци је утврђено код 3, односно 2 телета, док на Фарми 2 у наведеним терминима није утврђено ниједно теле са позитивним налазом антитела. На Фарми 1 било је могуће детектовати антитела од 10 до 120 дана након рођења телаци, 90 дана након рођења код 20%, 120 дана након рођења код свега 13,33%. На Фарми 2 антитела било могуће детектовати од 10 до 90 дана након рођења телаци, 90 дана након рођења код 13,33%. Слични резултати су добијени и у истраживању Agianniotaki и сар., 2018, где је било могуће утврдити присуство антитела код телаци пореклом од вакцинисаних крава од 0 до 90 дана након рођења. С тим што је 90 дана након рођења антитела било могуће утврдити само код 35, 7% телаци, док 120 дана након рођења ниједно теле није имало позитиван налаз антитела против LSDV. Познато је да присуство матерналних антитела може утицати на стварање активног имунитета код телаци узраста до 6



месеци. Телад пореклом од вакцинисаних или природно инфицираних мајки, а вакцинисана пре узраста од шест месеци могу имати неодговарајућу заштиту управо због интерференције матерналног имунитета са вакциналним сојем вируса (Woods, 1988; Turpurainen и Oura, 2012). Пасивни имунитет код јагњади пружа заштиту од инфекције вирусом богиња оваца до три месеца након рођења (EFSA, 2014). Abdelwahab и сар. 2016, наводе да је оптимално време за вакцинацију телаци против LSDV у узрасту од 4 месеца, у складу са резултатима њиховог истраживања. Перзистенција матерналних антитела је битан фактор који утиче на ефикасност вакцинације телаци, па тако и произвођачи вакцине препоручују вакцинацију телаци пореклом од вакцинисаних мајки у узрасту од 6 месеци. С обзиром да је вакцинација једна од најважнијих мера у борби против болести квргаве коже, значајно је избећи деловање матерналних антитела на вакцинални сој вируса. На основу изнетих резултата може се уочити да је количина антитела код већине испитаних телаци била испод прага детекције већ 3 месеца након рођења, тако да би било неопходно поново размотрити оптималан узраст за вакцинацију телаци пореклом од вакцинисаних мајки против LSDV да би се обезбедила најефикаснија заштита.

#### **6.4. ИСПИТИВАЊЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ОСЕТЉИВОСТИ МЕТОДА ELISA И ВНТ ЗА ДЕТЕКЦИЈУ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ**

Испитивање специфичности метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против LSDV у нашем истраживању је вршено на узорцима из банке серума НИВ-НС који су узорковани пре појаве LSD у Републици Србији и пре почетка кампање вакцинације говеда против ове болести. Резултати специфичности ВНТ од 100% су у складу са резултатима других аутора (Babiuk и сар., 2009а; Bowden и сар., 2009). Апсолутна специфичност ВНТ је потврђена и од стране других аутора (Bowden и сар., 2009). Испитивали су два експериментално инфицирана телета која су развила неутрализациона антитела 21 дан након инфекције, док су ELISA методом утврдили присуство антитела само код једног телета. Специфичност ELISA методе у нашем истраживању је била 99, 2%. Bowden и сарадници, (2009) су представили ELISA методу засновану на рекомбинантним протеинима (095 и 103) SPV и тестирањем 300

сигурно негативних говеђих серума из Аустралије утврдили да дијагностичка специфичност овог теста износи 95% (Bowden и сар, 2009). Специфичност ELISA теста од 96% је утврђена тестирањем 77 узорака серума животиња изван ендемских области везаних са LSD, док је у истом истраживању осетљивост ELISA теста од 100% утврђења тестирањем 14 узорака серума експериментално инфицираних говеда (Carn и сар., 1994). Вирус неутрализациони тест се сматра златним стандардом серолошке дијагностике CaV-a, веома је специфичан, али није довољно осетљив да детектује ниске нивое антитела код неких животиња након опоравка од природне инфекције (Kitching и Carn, 2008) или код сваке животиње која је била у контакту са LSDV (EFSA, 2015; OIE, 2016; EFSA, 2017). Резултате испитивања осетљивости метода ELISA и ВНТ у нашем истраживању, због недостатка сигурно позитивних серума треба са резервом узети у обзир. За испитивање осетљивости метода у детекцији антитела против LSDV коришћени су серуми пореклом од вакцинисаних крава, узорковани у различитим временским периодима након вакцинације. Уколико узмемо да се ВНТ сматра златним стандардом серолошке дијагностике LSD, и да је и његова осетљивост у нашем истраживању била 100%, могли смо израчунати осетљивост ELISA методе у односу на ВНТ, која је износила 88,24%. И други аутори су такође вршили поређење перформанси метода ELISA и ВНТ и утврдили да је осетљивост обе методе била 96%, док је специфичност ВНТ била 100%, а ELISA 95% (Babiuk и сар., 2009a). Осетљивост gP32 ELISA теста у односу на ВНТ за детекцију антитела против LSDV је износила 98,1%, док је специфичност износила 98,7% (Venkatesan и сар., 2017). Milovanović и сар. 2019, наводе да је у детекцији поствакциналних антитела против LSDV утврђена специфичност ELISA теста у односу на ВНТ износила 86%, док је осетљивост износила 85%. У истом истраживању вршено је поређење перформанси ELISA и IFAT теста, па је утврђена специфичност ELISA теста у односу на IFAT износила 76%, док је осетљивост износила 88%. За одређивање специфичности и осетљивости метода у детекцији антитела против LSDV користили смо и серуме пореклом од вакцинисаних крава и њихове телади, који су прикупљани код крава на дан партуса, а код телади у различитим терминима након рођења. На тај начин је вршено праћење трансфера матерналних антитела против LSDV путем колострума. Осетљивост и специфичност ELISA теста у детекцији антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади у односу на ВНТ, као златни стандард, износиле су 86,44% и 86,81%. Приказани резултати осетљивости и специфичности ELISA теста су у складу са

результатима других аутора (Samojlović и сар., 2019; Milovanović и сар. 2019). Такође смо израчунали и осетљивост и специфичност ВНТ у односу на ELISA тест за детекцију антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади, које су износиле 80,95% и 90,80%. EFSA наводи да се осетљивост ELISA тестова за детекцију антитела против вируса богиња оваца и коза креће у распону од 70% до 100%, док специфичност износи од 84% до 100%. Осетљивост ВНТ се креће у распону од 70% до 96%, док специфичност достиже 100% (EFSA, 2015).

У нашем истраживању се резултати упоредног испитивања метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против LSDV у узорцима крвних серума из банке серума и вакцинисаних крава нису подударали само у 2,77%, односно у 9 од укупно испитаних 325 узорака. Вредност *kappa* коефицијента је износила 0,913, што представља скоро савршену сагласност поређених метода (Thrusfield, 2007). У истраживању спроведеном од стране других аутора вршено је поређење метода ВНТ и индиректног имунофлуоресцентног теста за детекцију антитела против LSDV применом *kappa* статистике, где је вредност *kappa* коефицијента износила 0,70, а означава одличну сагласност поређених метода (Gari и сар., 2008). Применом *kappa* статистике вршено је поређење метода изолација вируса и PCR у дијагностици LSDV, где су резултати вредности *kappa* коефицијента били прилично ниски од само 0,29, што представља добру сагласност поређених метода (Elhaig и сар., 2017). Поређење метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против других вирусних болести говеда се такође спомиње у истраживањима различитих аутора. Скоро савршена сагласност метода ELISA и ВНТ, као и у нашем истраживању, је приказана у детекцији антитела против вируса говеђег рихотрхеитиса  $k=0,84$  (Obando и сар., 1999), у детекцији антитела против вируса говеђе вирусне дијареје  $k=0,994$  (Cho и сар., 1991) и  $k=0,935$  (Mahmoodi и сар., 2015), у детекцији антитела против вируса везикуларног стоматитиса  $k=0,92$  (Allende и Germano, 1993). У упоредном испитивању узорака крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади методама ELISA и ВНТ за детекцију антитела против вируса квргаве коже, резултати испитивања се нису подударали у 13,33%, односно у 40 узорака. Вредност *kappa* коефицијента је износила 0,7239, што представља одличну сагласност поређених метода. Може се уочити да се је број узорака који се нису подударали у упоредном испитивању метода ELISA и ВНТ четири пута био већи у испитивању детекције антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади, у односу на испитивање детекције антитела у узорцима крвних серума говеда из банке серума и вакцинисаних крава. Vitour et al, 2011 су такође вршили

поређење ВНТ и ELISA теста у детекцији матерналних антитела, код телади пореклом од вакцинисаних крава против вируса болести плавог језика. Добили су вредност *каппа* коефицијента 0,49 (врло добро слагање поређених метода), што је знатно ниже него у нашем истраживању. Поређење метода ELISA и ВНТ за детекцију антитела против других вирусних болести говеда се наводи у литератури. Врло добро слагање метода ELISA и ВНТ је приказано у детекцији антитела против вируса говеђег ринотрахеитиса  $k=0,56$  (Sagavanajaam и сар., 2017). Рађено је поређење четири различита ELISA теста (два блокирајућа и два индиректна) и ВНТ у детекцији антитела након вакцинације говеда против вируса слинавке и шапа и *каппа* индекс се кретао од 0,34 до 0,62, (добра до одлична сагласност метода) (Sala и сар., 2017).

## 7. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Модификовани ВНТ и комерцијални ELISA тест (произвођача „IDvet“) могу се користити за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже.
2. Модификовани ВНТ омогућава краће време извођења теста, од само три дана уз употребу MDBK континуиране културе ћелија и вируса болести квргаве коже изолованог из клинички оболелог говечета.
3. Код вакцинисаних крава прво присуство антитела утврђено је 20 дана након вакцинације, највиши ниво сероконверзије утврђен је 30 дана након вакцинације, а присуство антитела је било могуће детектовати током четири месеца након вакцинације, модификованим ВНТ код 34% крава, а ELISA тестом код 30% крава.
4. Од 30 испитаних телади, 90 дана након тељења било је могуће утврдити 5 (16,67%) телади са позитивним налазом антитела, 105 дана након тељења 3 телета (10%) са позитивним налазом антитела, док су у последњем термину узорковања 120 дана након тељења утврђена свега 2 (6,67%) позитивна налаза антитела против вируса болести квргаве коже.
5. Ниво антитела код 25 од 30 (83,33%) испитаних телади је био испод прага детекције већ 3 месеца након тељења, тако да је неопходно размотрити оптималан узраст за вакцинацију телади пореклом од вакцинисаних крава против вируса болести квргаве коже да би се обезбедила ефикаснија заштита телади која потичу од вакцинисаних крава.
6. Анализом вредности S/P односа утврђених ELISA тестом и титра антитела утврђених ВНТ утврђен је статистички значајно већи ниво антитела у колостралном у односу на крвни серум крава.
7. Упоредно испитивање модификованог ВНТ и комерцијалног ELISA теста за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума из банке серума и вакцинисаних крава показало је скоро савршену сагласност поређених метода, а вредност *каппа* индекса је износила 0,913.
8. Специфичност модификованог ВНТ за детекцију антитела против вируса

болести квргаве коже у узорцима крвних серума из банке серума је 100%, а комерцијалног ELISA теста 99,2%, док је осетљивост комерцијалног ELISA теста у односу на модификовани ВНТ за детекцију антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава 88,24%.

9. Упоредно испитивање модификованог ВНТ и комерцијалног ELISA теста за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади показало је високу сагласност поређених метода, а вредност *kappa* индекса је износила 0,7239.
10. Специфичност и осетљивост комерцијалног ELISA теста у односу на модификовани ВНТ за детекцију антитела против вируса болести квргаве коже у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади износе 86,81% и 86,44%, док специфичност и осетљивост модификованог ВНТ у односу на комерцијални ELISA тест за детекцију антитела у узорцима крвних серума вакцинисаних крава и њихове телади износе 90,80% и 80,95%.

## 8. КОРИШЋЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Abd-Elfatah, E., El-Mekki, M., Aboul-Soud, E., Fawzi, E., & El-Soally, S. (2019). Immunological response of a new trivalent Cav vaccine in pregnant ewes and does. *Slovenian Veterinary Research*, 56(22-Suppl), 445-455.
2. Abdelwahab M.G., Khafagy H.A., Moustafa A.M. & Saad, M. A. (2016). Evaluation of humoral and cell-mediated immunity of lumpy skin disease vaccine prepared from local strain calves and its related to maternal immunity. *Journal of American Science*, 21(10), 38-45.
3. Abutarbush, S. M., & Tuppurainen, E. S. (2018). Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM 65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease. *Transboundary and emerging diseases*, 65(6), 1657-1663.
4. Abutarbush, S. M., Ababneh, M. M., Al Zoubi, I. G., Al Sheyab, O. M., Al Zoubi, M. G., Alekish, M. O., & Al Gharabat, R. J. (2015). Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(5), 549-554.
5. Abutarbush, S. M., Hananeh, W. M., Ramadan, W., Al Sheyab, O. M., Alnajjar, A. R., Al Zoubi, I. G., ... & Tuppurainen, E. S. M. (2016). Adverse reactions to field vaccination against lumpy skin disease in Jordan. *Transboundary and emerging diseases*, 63(2), e213-e219.
6. Agag, B. I., Mousa, S., Hassan, H. B., Saber, M. S., El-Deghidy, N. S., & El-Aziz, A. M. A. (1992). Clinical, serological and biochemical studies on lumpy skin disease. *Journal of Applied Animal Research*, 1(1), 13-23.
7. Agianniotaki, E. I., Babiuk, S., Katsoulos, P. D., Chaintoutis, S. C., Praxitelous, A., Quizon, K., ... & Dovas, C. I. (2018). Colostrum transfer of neutralizing antibodies against lumpy skin disease virus from vaccinated cows to their calves. *Transboundary and emerging diseases*, 65(6), 2043-2048.
8. Al-Salihi, K. (2014). Lumpy skin disease: Review of literature. *Mirror of research in veterinary sciences and animals*, 3(3), 6-23.
9. Ali, A. A., Esmat, M., Attia, H., Selim, A., & Abdel-Hamid, Y. M. (1990). Clinical and pathological studies of lumpy skin disease in Egypt. *Veterinary Record*, 127(22), 549-550.
10. Allende, R., & Germano, P. M. L. (1993). Comparison of virus neutralisation and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 12(3), 849-855.
11. Annandale, C. H., Irons, P. C., Bagla, V. P., Osuagwuh, U. I., & Venter, E. H. (2010). Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls. *Reproduction in domestic animals*, 45(2), 250-255.
12. Ateya, L. A. F., Ahmed S.A., Ayman H.M., Ashraf K., Heba A.A.H. (2017). Isolation and identification of lumpy skin disease virus in cattle in Kalubeya governorate. *Journal of Virological Sciences*, 1(1), 12-19.
13. Atkinson, D. E., Boyd, R. D. H., & Sibley, C. P. (2006). Placental transfer. In *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (pp. 2787-2846). Academic Press.
14. Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39.
15. Awad, W. S., Ibrahim, A. K., Mahran, K., Fararh, K. M., & Moniem, M. I. A. (2010). Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin disease in cows. *Tropical animal health and production*, 42(4), 777-783.

16. Awadin, W., Hussein, H., Elseady, Y., Babiuk, S., & Furuoka, H. (2011). Detection of lumpy skin disease virus antigen and genomic DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from an Egyptian outbreak in 2006. *Transboundary and emerging diseases*, 58(5), 451-457.
17. Ayelet, G., Abate, Y., Sisay, T., Nigussie, H., Gelaye, E., Jemberie, S., & Asmare, K. (2013). Lumpy skin disease: preliminary vaccine efficacy assessment and overview on outbreak impact in dairy cattle at Debre Zeit, central Ethiopia. *Antiviral research*, 98(2), 261-265.
18. Ayelet, G., Haftu, R., Jemberie, S., Belay, A., Gelaye, E., Sibhat, B., Skjerve E., & Asmare, K. (2014). Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of the virus. *Rev. Sci. Tech*, 33(3), 877-87.
19. Babiuk, S. (2018a). Replication in a Host. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 37-40). Springer, Cham.
20. Babiuk, S. (2018b). Clinical Signs. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 65-69). Springer, Cham.
21. Babiuk, S. (2018c). Immunity. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 65-69). Springer, Cham.
22. Babiuk, S. (2018d). Diagnostic tools. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 73-79). Springer, Cham.
23. Babiuk, S., Bowden, T. R., Boyle, D. B., Wallace, D. B., & Kitching, R. P. (2008a). CaVes: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transboundary and emerging Diseases*, 55(7), 263-272.
24. Babiuk, S., Bowden, T. R., Parkyn, G., Dalman, B., Hoa, D. M., Long, N. T., ... & Boyle, D. B. (2009b). Yemen and Vietnam CaVes demonstrate a distinct host preference for goats compared with sheep. *Journal of General Virology*, 90(1), 105-114.
25. Babiuk, S., Bowden, T. R., Parkyn, G., Dalman, B., Manning, L., Neufeld, J., ... & Boyle, D. B. (2008b). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55(7), 299-307.
26. Babiuk, S., Parkyn, G., Copps, J., Larence, J. E., Sabara, M. I., Bowden, T. R., ... & Kitching, R. P. (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3. Ts) for propagation of CaV isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 19(5), 486-491.
27. Babiuk, S., Wallace, D. B., Smith, S. J., Bowden, T. R., Dalman, B., Parkyn, G., ... & Boyle, D. B. (2009a). Detection of antibodies against CaVes using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transboundary and emerging Diseases*, 56(4), 132-141.
28. Balinsky, C. A., Delhon, G., Smoliga, G., Prarat, M., French, R. A., Geary, S. J., ... & Rodriguez, L. L. (2008). Rapid preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 438-442.
29. Barman, D., Chatterjee, A., Guha, C., Biswas, U., Sarkar, J., Roy, T. K., ... & Baidya, S. (2010). Estimation of post-vaccination antibody titre against goat pox and determination of protective antibody titre. *Small ruminant research*, 93(2-3), 76-78.
30. Barnard, B. J. H. (1997). Antibodies against some viruses of domestic animals in southern African wild animals. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64, 95-110.
31. Baumrucker, C. R., Dechow, C. D., Macrina, A. L., Gross, J. J., & Bruckmaier, R. M. (2016). Mammary immunoglobulin transfer rates following prepartum milking. *Journal of dairy science*, 99(11), 9254-9262.



32. Bedeković, T., Šimić, I., Krešić, N., & Lojkić, I. (2018). Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), 491-496. Paris: OIE; 2008. p. 1058-68.
33. Ben-Gera, J., Klement, E., Khinich, E., Stram, Y., & Shpigel, N. Y. (2015). Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease—The results of a randomized controlled field study. *Vaccine*, 33(38), 4837-4842.
34. Bowden, T. R., Babiuk, S. L., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2008). CaV tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371(2), 380-393.
35. Bowden, T. R., Coupar, B. E., Babiuk, S. L., White, J. R., Boyd, V., Duch, C. J., ... & Boyle, D. B. (2009). Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant CaV antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods*, 161(1), 19-29.
36. Brenner, J., Bellaiche, M., Gross, E., Elad, D., Oved, Z., Haimovitz, M., ... & Yadin, H. (2009). Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease: statutory challenge. *Vaccine*, 27(10), 1500-1503.
37. Buller, R. M., & Palumbo, G. J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(1), 80-122.
38. Carn, V. M. (1993). Control of CaV infections. *Vaccine*, 11(13), 1275-1279.
39. Carn, V. M., & Kitching, R. P. (1995). The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Archives of virology*, 140(3), 503-513.
40. Carn, V. M., & Kitching, R. P. (1995b). The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Archives of virology*, 140(3), 503-513.
41. Carn, V. M., Kitching, R. P., Hammond, J. M., & Chand, P. (1994). Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to CaV. *Journal of virological methods*, 49(3), 285-294.
42. Chand, P. (1992). *Molecular and immunological characterisation of a major envelope protein of CaV* (Doctoral dissertation, University of Surrey).
43. Chand, P. (1992). *Molecular and immunological characterisation of a major envelope protein of CaV* (Doctoral dissertation, University of Surrey).
44. Chaudhri, G., Panchanathan, V., Bluethmann, H., & Karupiah, G. (2006). Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *Journal of virology*, 80(13), 6339-6344.
45. Chihota, C. M., Rennie, L. F., Kitching, R. P., & Mellor, P. S. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiology & Infection*, 126(2), 317-321.
46. Chihota, C. M., Rennie, L. F., Kitching, R. P., & Mellor, P. S. (2003). Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 294-300.
47. Cho, H. J., Masri, S. A., Deregt, D., Yeo, S. G., & Thomas, E. J. (1991). Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibody in cattle. *Canadian journal of veterinary research*, 55(1), 56.
48. Coetzer, J. A. W., & Tuppurainen, E. (2004). Lumpy skin disease. *Infectious diseases of livestock*, 2, 1268-1276.

49. Cvetnić, S. (2005). *Virusne bolesti životinja*. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti.
50. Davies, F. G. (1991a). Lumpy skin disease of cattle: a growing problem in Africa and the Near East. *World Animal Review*, 68(3), 37-42.
51. Davies, F. G. (1991b). Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. *British Veterinary Journal*, 147(6), 489-503.
52. Davies, F. G., & Otema, C. (1981). Relationships of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. *Research in veterinary science*, 31(2), 253-255.
53. Davies, F. G., Krauss, H., Lund, J., & Taylor, M. (1971). The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Research in Veterinary Science*, 12(2), 123-128.
54. De, K. C., & Goris, N. (2004). Extending the foot-and-mouth disease module to the control of other diseases. *Developments in biologicals*, 119, 333-340.
55. Diallo, A., & Viljoen, G. J. (2007). Genus CaV. In *Poxviruses* (pp. 167-181). Birkhäuser Basel.
56. Edghill-Smith, Y., Golding, H., Manischewitz, J., King, L. R., Scott, D., Bray, M., ... & Reimann, K. A. (2005). Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nature medicine*, 11(7), 740.
57. El-Nahas, E. M., El-Habbaa, A. S., El-Bagoury, G. F., & Radwan, M. E. (2011). Isolation and identification of lumpy skin disease virus from naturally infected buffaloes at Kaluobia, Egypt. *Global Veterinaria*, 7(3), 234-237.
58. Elhaig, M. M., Selim, A., & Mahmoud, M. (2017). Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), 1-6.
59. Embury-Hyatt, C., Babiuk, S., Manning, L., Ganske, S., Bowden, T. R., Boyle, D. B., & Copps, J. (2012). Pathology and viral antigen distribution following experimental infection of sheep and goats with CaV. *Journal of comparative pathology*, 146(2-3), 106-115.
60. European Food Safety Authority (EFSA) (2014). Scientific Opinion on sheep and goat pox. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal*, 12(11), 3885.
61. European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Scientific Opinion on Lumpy Skin Disease. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal*, 13(1), 3986.
62. European Food Safety Authority (EFSA) (2017). Lumpy skin disease: I. Data collection and analysis. *EFSA Journal*, 15(4), 4773.
63. European Food Safety Authority (EFSA) (2018). Lumpy skin disease: II. Data collection and analysis. *EFSA Journal*, 16(2), 5176.
64. Fagbo, S., Coetzer, J. A., & Venter, E. H. (2014). Seroprevalence of Rift Valley fever and lumpy skin disease in African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park and Hluhluwe-iMfolozi Park, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1), 01-07.
65. Furman-Fratczak, K., Rzasca, A., & Stefaniak, T. (2011). The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. *Journal of dairy science*, 94(11), 5536-5543.
66. Gari Jimolu, G. (2011b). *Epidemiological Study of Lumpy Skin Disease and Its Economic Impact in Ethiopia* (Doctoral dissertation).
67. Gari, G., Abie, G., Gizaw, D., Wubete, A., Kidane, M., Asgedom, H., ... & Tuppurainen, E. S. (2015). Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three CaV vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine*, 33(28), 3256-3261.

68. Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P., & Roger, F. (2008). Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary microbiology*, 129(3-4), 269-280.
69. Gari, G., Bonnet, P., Roger, F., & Waret-Szkuta, A. (2011a). Epidemiological aspects and financial impact of lumpy skin disease in Ethiopia. *Preventive veterinary medicine*, 102(4), 274-283.
70. Gari, G., Waret-Szkuta, A., Grosbois, V., Jacquiet, P., & Roger, F. (2010). Risk factors associated with observed clinical lumpy skin disease in Ethiopia. *Epidemiology & Infection*, 138(11), 1657-1666.
71. Garner, M. G., & Lack, M. B. (1995). Modelling the potential impact of exotic diseases on regional Australia. *Australian veterinary journal*, 72(3), 81-87.
72. Gelaye, E., Lamien, C. E., Silber, R., Tuppurainen, E. S., Grabherr, R., & Diallo, A. (2013). Development of a cost-effective method for CaV genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PloS one*, 8(10), e75971.
73. Gershon, P. D., & Black, D. N. (1988). A comparison of the genomes of CaV isolates of sheep, goats, and cattle. *Virology*, 164(2), 341-349.
74. Green, H. F. (1959). Lumpy skin disease; its effect on hides and leather and a comparison in this respect with some other skin diseases. *Bull. Epizootic Dis. of Africa*, 7, 63-79.
75. Gulbahar, M. Y., Davis, W. C., Yuksel, H., & Cabalar, M. (2006). Immunohistochemical evaluation of inflammatory infiltrate in the skin and lung of lambs naturally infected with sheeppox virus. *Veterinary pathology*, 43(1), 67-75.
76. Gulyaz, V. (1999). Investigation of immunity in the lambs borned from ewes vaccinated with sheep and goat pox vaccine. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 30(2), 55-62.
77. Hamidouche, M., Belmessabih, N., Boubguira, A., Benfenatki, A., Saada, N., Sail, A., & Bacha, F. (2018). CaV antibodies detection: Relationship between the two methods alpha and beta of virus neutralisation test. *Open Veterinary Journal*, 8(3), 340-346.
78. Hedger, R. S., & Hamblin, C. (1983). Neutralising antibodies to lumpy skin disease virus in African wildlife. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 6(3), 209-213.
79. Heine, H. G., Stevens, M. P., Foord, A. J., & Boyle, D. B. (1999). A CaV detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of immunological methods*, 227(1-2), 187-196.
80. House, J. A., Wilson, T. M., Nakashly, S. E., Karim, I. A., Ismail, I., Danaf, N. E., ... & Ayoub, N. N. (1990). The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus-from cattle in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(2), 111-115.
81. Hunter, P., & Wallace, D. (2001). Lumpy skin disease in southern Africa: a review of the disease and aspects of control. *Journal of the South African Veterinary Association*, 72(2), 68-71.
82. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2018 International des Epizooties, Manual of Diagnostic Tests
83. Irons, P. C., Tuppurainen, E. S. M., & Venter, E. H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, 63(5), 1290-1297.
84. Ivana, L., Ivana, Š., Nina, K., & Tomislav, B. (2018). Complete Genome Sequence of a Lumpy Skin Disease Virus Strain Isolated from the Skin of a Vaccinated Animal. *Genome announcements*.

85. Kalra, S. K., & Sharma, V. K. (1981). Adaptation of Jaipur strain of sheeppox virus in primary lamb testicular cell culture. *Indian journal of experimental biology*.
86. Katsoulos, P. D., Chaintoutis, S. C., Dovas, C. I., Polizopoulou, Z. S., Brellou, G. D., Agianniotaki, E. I., ... & Boscós, C. (2018). Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. *Transboundary and emerging diseases*, 65(1), 174-185.
87. Khafagy, H. A., Abdelwahab, M. G., Mustafa, A. M., & Saadb, M. A. (2016). Preparation and field evaluation of live attenuated sheep pox vaccine for protection of calves against lumpy skin disease. *Benha Veterinary Medical Journal*, 31, 1-7.
88. Khalafalla, A. I., Elamin, M. G., & Abbas, Z. (1993). Lumpy skin disease: observations on the recent outbreaks of the disease in the Sudan. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 46(4), 548-550.
89. Kitching RP, Carn VM. Sheep pox and goat pox. In: Office
90. Kitching, R. P. (1986a). The control of sheep and goat pox. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)*.
91. Kitching, R. P. (1986b). Passive protection of sheep against CaV. *Research in veterinary science*, 41(2), 247-250.
92. Kitching, R. P. (2003). Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Developments in biologicals*, 114, 161-167.
93. Kitching, R. P., Hammond, J. M., & Taylor, W. P. (1987). A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*, 42(1), 53-60.
94. Klement, E., Broglia, A., Antoniou, S. E., Tsiamadis, V., Plevraki, E., Petrović, T., ... & Marojevic, D. (2018). Neethling vaccine proved highly effective in controlling lumpy skin disease epidemics in the Balkans. *Preventive veterinary medicine*.
95. Kumar, S. M. (2011). An outbreak of lumpy skin disease in a Holstein dairy herd in Oman: a clinical report. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(8), 851-859.
96. Lamien, C. E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D. B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., ... & Luckins, A. G. (2011b). Use of the CaV homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Veterinary microbiology*, 149(1-2), 30-39.
97. Lamien, C. E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijevic, M., ... & Diallo, A. (2011a). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of CaVes. *Journal of virological methods*, 171(1), 134-140.
98. LARSON, B. L. (1992). Immunoglobulins of the mammary secretions. *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*.
99. Lubinga, J. C., Tuppurainen, E. S. M., Stoltsz, W. H., Ebersohn, K., Coetzer, J. A. W., & Venter, E. H. (2013). Detection of lumpy skin disease virus in saliva of ticks fed on lumpy skin disease virus-infected cattle. *Experimental and applied acarology*, 61(1), 129-138.
100. Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2010). *Fenner's veterinary virology*. Academic press.
101. Mahmoodi, P., Shapouri, M. R. S. A., Ghorbanpour, M., Hajikolaei, M. R. H., Lotfi, M., Boroujeni, M. P., & Daghari, M. (2015). Simple Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies Against Bovine Viral Diarrhea Virus,

- Based on Prokaryotically Expressed Recombinant MBP-NS3 Protein. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(3).
102. Mercer, A., Schmidt, A., & Weber, O. (Eds.). (2007). *Poxviruses*. Springer Science & Business Media.
  103. Mercer, J., & Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320(5875), 531-535.
  104. Mikhael C.A., Nakhla O.E., Mohamed N.A. (2017). Study on the capability of a dual capripox vaccine in protection of cattle against LSD infection. *Journal of veterinary medical research*, 24 (1), 224-233.
  105. Milovanović, M., Dietze, K., Milićević, V., Radojičić, S., Valčić, M., Moritz, T., & Hoffmann, B. (2019). Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC veterinary research*, 15(1), 80.
  106. Molla, W., de Jong, M. C., Gari, G., & Frankena, K. (2017). Economic impact of lumpy skin disease and cost effectiveness of vaccination for the control of outbreaks in Ethiopia. *Preventive veterinary medicine*, 147, 100-107.
  107. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary virology*. Elsevier.
  108. Ngichabe, C. K., Wamwayi, H. M., Ndungu, E. K., Mirangi, P. K., Bostock, C. J., Black, D. N., & Barrett, T. (2002). Long term immunity in African cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest virus vaccine. *Epidemiology & Infection*, 128(2), 343-349.
  109. Norian, R., Ahangran, N. A., Varshovi, H. R., & Azadmehr, A. (2019). Comparative efficacy of two heterologous capripox vaccines to control lumpy skin disease in cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 22(2), 171-179.
  110. OIE (World Organisation for Animal Health) (2016). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.4.13, Lumpy Skin Disease. OIE, Paris, 1–14.
  111. OIE (World Organisation for Animal Health) (2017a). OIE Technical Disease Card, Lumpy Skin Disease. OIE, Paris, 1-5.
  112. OIE (World Organisation for Animal Health) (2017b). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.7.13, Sheep pox and goat pox. OIE, Paris, 1–14.
  113. OIE (World Organisation for Animal Health) (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.4.12, Lumpy Skin Disease. OIE, Paris, 1158–1171.
  114. Orlova, E. S., Shcherbakov, A. V., Diev, V. I., & Zakharov, V. M. (2006). Differentiation of CaV species and strains by polymerase chain reaction. *Molecular Biology*, 40(1), 139-145.
  115. Osuagwuh, U. I., Bagla, V., Venter, E. H., Annandale, C. H., & Irons, P. C. (2007). Absence of lumpy skin disease virus in semen of vaccinated bulls following vaccination and subsequent experimental infection. *Vaccine*, 25(12), 2238-2243.
  116. Panchanathan, V., Chaudhri, G., & Karupiah, G. (2006). Protective immunity against secondary poxvirus infection is dependent on antibody but not on CD4 or CD8 T-cell function. *Journal of virology*, 80(13), 6333-6338.
  117. Parker, A. K., Parker, S., Yokoyama, W. M., Corbett, J. A., & Buller, R. M. L. (2007). Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *Journal of virology*, 81(8), 4070-4079.
  118. Pfeffer, M., & Meyer, H. (2007). Poxvirus diagnostics. In *Poxviruses* (pp. 355-373). Birkhäuser Basel.

119. Prozesky, L., & Barnard, B. J. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 49(3), 167-175.
120. Rao, T. V. S., & Negi, B. S. (1997). Evaluation of different serological tests for the diagnosis of goat pox using soluble antigens. *Tropical animal health and production*, 29(4), 235-239.
121. Rouby, S., & Aboulsoud, E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *The Veterinary Journal*, 209, 193-195.
122. Sadri, R., Masoudi, S., Kargar, R., KHEDMATI, K., Varshovi, H., & Haghighi, S. (2002). A single radial haemolysis technique for rapid diagnosis of goat pox diseases.
123. Sala, J. M., Trotta, M. V., Mansilla, F. C., Pérez-Filgueira, M., Caspe, S. G., & Capozzo, A. V. (2018). Alternatives for the serological assessment of foot-and-mouth disease vaccine immunity in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 451-458.
124. Salib, F. A., & Osman, A. H. (2011). Incidence of lumpy skin disease among Egyptian cattle in Giza Governorate, Egypt. *Veterinary World*, 4(4).
125. Salnikov, N., Usadov, T., Kolcov, A., Zhivoderov, S., Morgunov, Y., Gerasimov, V., ... & Kolbasov, D. (2018). Identification and characterization of lumpy skin disease virus isolated from cattle in the Republic of North Ossetia-Alania in 2015. *Transboundary and emerging diseases*, 65(3), 916-920.
126. Samojlović, M., Polaček, V., Gurjanov, V., Lupulović, D., Lazić, G., Petrović, T., & Lazić, S. (2019). Detection of antibodies against Lumpy skin disease virus by Virus neutralization test and ELISA methods. *Acta Veterinaria*, 69(1), 47-60.
127. Santos, G. D., Silva, J. T. D., Santos, F. H. D. R., & Bittar, C. M. M. (2017). Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(1), 72-79.
128. Saravanajayam, M., Kumanan, K., Balasubramaniam, A., & Palanivel, K. M. (2017). Comparison of Three Immunological Assays to Detect Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) Antibodies in Buffaloes.
129. Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., ... & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annual review of immunology*, 21(1), 377-423.
130. Tageldin, M. H., Wallace, D. B., Gerdes, G. H., Putterill, J. F., Greyling, R. R., Phosiwa, M. N., ... & Al Ismaaily, S. I. (2014). Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. *Tropical animal health and production*, 46(1), 241-246.
131. Tageldin, M. H., Wallace, D. B., Gerdes, G. H., Putterill, J. F., Greyling, R. R., Phosiwa, M. N., ... & Al Ismaaily, S. I. (2014). Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. *Tropical animal health and production*, 46(1), 241-246.
132. Thrusfield, M. (2007). *Veterinary epidemiology*. Third Edition. Blackwell Science Ltd., Oxford.
133. Tilahun, Z., Berecha, B., Simenew, K., & Reta, D. (2014). Towards effective vaccine production: A controlled field trial on the immunological response of three lumpy skin disease vaccine strains in dairy farms. *Acad J Anim Dis*, 3(3), 17-26.
134. Toplak, I., Petrović, T., Vidanović, D., Lazić, S., Šekler, M., Manić, M., ... & Kuhar, U. (2017). Complete genome sequence of lumpy skin disease virus isolate SERBIA/Bujanovac/2016, detected during an outbreak in the Balkan Area. *Genome Announc.*, 5(35), e00882-17.

135. Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of virology*, 75(15), 7122-7130.
136. Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J. H., Sandybaev, N. T., ... & Rock, D. L. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *Journal of virology*, 76(12), 6054-6061.
137. Tuppurainen, E. (2015). Evaluation of vector potential of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus decoloratus* ticks for lumpy skin disease virus. PhD thesis. University of Helsinki, Faculty of veterinary medicine, Department of applied sciences.
138. Tuppurainen, E. S. M., & Oura, C. A. (2012). lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and emerging diseases*, 59(1), 40-48.
139. Tuppurainen, E. S. M., Venter, E. H., Shisler, J. L., Gari, G., Mekonnen, G. A., Juleff, N., ... & Babiuk, S. (2017). CaV diseases: current status and opportunities for control. *Transboundary and emerging diseases*, 64(3), 729-745.
140. Tuppurainen, E. S., Lubinga, J. C., Stoltz, W. H., Troskie, M., Carpenter, S. T., Coetzer, J. A., ... & Oura, C. A. (2013). Evidence of vertical transmission of lumpy skin disease virus in *Rhipicephalus decoloratus* ticks. *Ticks and tick-borne diseases*, 4(4), 329-333.
141. Tuppurainen, E. S., Venter, E. H., & Coetzer, J. A. W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 72(2), 153-164.
142. Varshovi, H. R., Norian, R., Azadmehr, A., & Afzal Ahangaran, N. (2018). Immune response characteristics of Capri pox virus vaccines following emergency vaccination of cattle against lumpy skin disease virus. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 9(2), 33-40.
143. Venkatesan, G., Teli, M. K., Sankar, M., Kumar, A., Dashprakash, M., Arya, S., ... & Pandey, A. B. (2018). Expression and evaluation of recombinant P32 protein based ELISA for sero-diagnostic potential of capripox in sheep and goats. *Molecular and cellular probes*, 37, 48-54.
144. Vidanović, D., Šekler, M., Petrović, T., Debeljak, Z., Vasković, N., Matović, K., & Hoffmann, B. (2016). Real-time PCR assays for the specific detection of field Balkan strains of lumpy skin disease virus. *Acta veterinaria*, 66(4), 444-454.
145. Vitour, D., Guillotin, J., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Wolff, F., ... & Zientara, S. (2011). Colostral antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccines in calves. *Veterinary research*, 42(1), 18.
146. Wallace, D. B., Weyer, J., Nel, L. H., & Viljoen, G. J. (2007). Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *Journal of virological methods*, 146(1-2), 52-60.
147. Weiss, K. E. (1968). Lumpy skin disease virus. In *Cytomegaloviruses. Rinderpest Virus. Lumpy Skin Disease Virus* (pp. 111-131). Springer, Berlin, Heidelberg.
148. Woods, J. A. (1988). Lumpy skin disease—a review. *Tropical Animal Health and Production*, 20(1), 11-17.
149. Zinoviev, V. V., Tchikaev, N. A., Chertov, O. Y., & Malygin, E. G. (1994). Identification of the gene encoding vaccinia virus immunodominant protein p35. *Gene*, 147(2), 209-214.

## 9. ПРИЛОЗИ

### 9.1. Прилог 1. Подаци о кравима из банке серума НИВ-НС– ID бројеви ушних маркица, резултати испитивања методама ELISA и ВНТ.

Р. бр.	ID краве	ELISA (S/P %)	ВНТ (log <sub>2</sub> )
1	CS7181709810	0,45	0
2	CS7191798033	0,27	0
3	CS7170204114	<b>69,19</b>	0
4	RS7142738540	0,36	0
5	CS7141435558	0,45	0
6	CS7132043828	0,18	0
7	RS7122613414	1,34	0
8	RS7104769447	2,23	0
9	RS7125597284	0,18	0
10	RS7163688538	0,62	0
11	CS7180259318	1,96	0
12	CS7111451494	2,23	0
13	CS7152319029	0,53	0
14	RS7162533934	0,71	0
15	CS7150800265	0,18	0
16	CS7132317451	1,16	0
17	CS7121410177	2,58	0
18	CS7112317452	0,62	0
19	RS7182614552	2,32	0
20	CS7182184000	0,62	0
21	CS7182184397	0,53	0
22	RS7153492985	1,78	0
23	CS7132318974	1,75	0
24	CS7152318973	5,34	0
25	CS7171686705	0,27	0
26	RS7103491525	3,56	0
27	CS7121784831	5,97	0
28	RS7173183255	0,00	0
29	RS7113444524	0,62	0
30	RS7173444559	0,36	0
31	RS7143444594	1,16	0
32	RS7193444596	0,98	0
33	RS7123664365	0,00	0
34	RS7123594749	1,07	0
35	RS7163801916	0,00	0
36	RS7113830704	1,25	0
37	RS7135205407	0,89	0
38	RS7135680715	0,27	0
39	RS7104041598	0.80	0
40	CS7171942606	0,62	0
41	RS7184278964	0,18	0
42	CS7111709979	1,07	0
43	CS7121709988	0,00	0
44	CS7191941007	0,00	0
45	RS7113141758	1,60	0
46	RS7172905995	0,53	0
47	RS7103005704	1,96	0
48	CS7141709831	1,42	0
49	RS7162753780	0,00	0
50	RS7112850203	2,67	0
51	RS7155158749	0,36	0
52	RS7174619162	0,62	0
53	CS7151943089	1,42	0
54	RS7103545019	0,53	0
55	CS7101923871	0,09	0
56	RS7123663667	0,18	0
57	RS7164042986	3,03	0
58	CS7171787785	0,18	0
59	CS7112336361	0,00	0
60	RS7122916147	0,00	0
61	RS7134168816	0,09	0
62	CS7131925171	0,18	0
63	RS7152736828	0,09	0
64	CS7172337287	0,62	0
65	CS7131439482	1,34	0
66	CS7141439491	0,00	0
67	CS7140257335	0,00	0
68	CS7121432650	0,09	0
69	RS7193122826	0,09	0
70	CS7102041901	0,53	0
71	CS7151430640	0,71	0
72	CS7111709979	0,00	0
73	CS7121709988	0,09	0
74	CS7162094699	1,25	0
75	CS7110795322	0,00	0
76	RS7123264145	0,27	0
77	RS7152749500	0,27	0
78	CS7121796928	0,89	0
79	CS7172092548	0,27	0
80	RS7174800717	1,60	0
81	CS7121690210	0,00	0



<b>82</b>	RS7173023078	0,27	0
<b>83</b>	RS7155594477	0,18	0
<b>84</b>	RS7103132269	0,45	0
<b>85</b>	RS7165630031	0,27	0
<b>86</b>	RS7163493569	0,71	0
<b>87</b>	RS7104686715	2,17	0
<b>88</b>	CS7131431136	0,36	0
<b>89</b>	CS7151692180	0,00	0
<b>90</b>	CS7131689169	0,00	0
<b>91</b>	CS7152312240	0,00	0
<b>92</b>	RS7174832983	1,34	0
<b>93</b>	RS7124399935	0,00	0
<b>94</b>	CS7111941742	0,00	0
<b>95</b>	RS7192614231	0,00	0
<b>96</b>	CS7171693150	0,00	0
<b>97</b>	RS7122786037	0,00	0
<b>98</b>	CS7162318717	0,00	0
<b>99</b>	CS7122318719	0,00	0
<b>100</b>	RS7184807266	0,00	0
<b>101</b>	RS7172705133	0,00	0
<b>102</b>	CS7171355569	0,00	0
<b>103</b>	CS7191355568	0,00	0
<b>104</b>	CS7190258422	0,00	0

<b>105</b>	RS7193674549	0,00	0
<b>106</b>	RS7135205407	1,20	0
<b>107</b>	RS7135680715	0,00	0
<b>108</b>	RS7104041598	0,10	0
<b>109</b>	RS7124041597	0,00	0
<b>110</b>	RS7164041656	0,90	0
<b>111</b>	RS7183264454	0,00	0
<b>112</b>	RS7163264450	0,00	0
<b>113</b>	RS7103264453	0,00	0
<b>114</b>	RS7193420109	1,30	0
<b>115</b>	RS7134149936	0,20	0
<b>116</b>	CS7191431652	0,00	0
<b>117</b>	RS7124318345	2,10	0
<b>118</b>	RS7104318346	0,00	0
<b>119</b>	CS7161784711	0,90	0
<b>120</b>	RS7162946581	4,50	0
<b>121</b>	RS7132946587	5,70	0
<b>122</b>	CS7140175405	0,00	0
<b>123</b>	RS7164800751	0,00	0
<b>124</b>	RS7165103544	1,60	0
<b>125</b>	RS7105578187	0,00	0

**9.2. Прилог 2. Подаци о вакцинисаним кравима – ID бројеви ушних маркица, датум вакцинације, старост и раса.**

**Вакцинисане краве код којих је узорковање вршено 0, 10, 20, 30, 45, 60 и 75 дана након вакцинације.**

<b>Редни број</b>	<b>ID краве</b>	<b>Датум вакцинације</b>
1	RS7105271530	05.08.2016.
2	RS7195232743	05.08.2016.
3	RS7185257738	05.08.2016.
4	RS7183624178	05.08.2016.
5	RS7165269836	05.08.2016.
6	RS7104786475	05.08.2016.
7	RS7114537131	05.08.2016.
8	RS7163624103	05.08.2016.
9	RS7164786364	05.08.2016.
10	RS7134418801	05.08.2016.
11	RS7195269774	05.08.2016.
12	RS7154418782	05.08.2016.
13	RS7193492281	05.08.2016.
14	RS7104041471	05.08.2016.
15	CS7121922309	05.08.2016.
16	RS7124786479	05.08.2016.
17	RS7155265688	05.08.2016.
18	RS7193624106	05.08.2016.
19	RS7152612818	05.08.2016.
20	RS7135265670	05.08.2016.

**Вакцинисане краве код којих је узорковање вршено 90 дана након вакцинације.**

<b>Редни број</b>	<b>ID краве</b>	<b>Датум вакцинације</b>	<b>Старост (година)</b>	<b>Раса</b>
1	RS 7173340806	09.08.2016.	8	Сименталска
2	RS 7174871187	09.08.2016	2	Сименталска
3	RS 7124892205	09.08.2016.	2	Сименталска
4	RS 7184818142	09.08.2016.	4,5	Сименталска
5	RS 7144854995	09.08.2016.	3	Сименталска
6	RS 7145852575	15.08.2016.	1,5	Сименталска
7	RS 7165814695	15.08.2016.	1,5	Мелез
8	CS 7192315859	15.08.2016.	10	Холштајн-фризијска
9	RS 7194806313	15.08.2016.	3,5	Холштајн-фризијска
10	DE 0352752433	15.08.2016.	7	Холштајн-фризијска
11	RS 7155724704	09.08.2016.	5	Холштајн-фризијска
12	RS 7105483014	09.08.2016.	5	Мелез
13	RS 7185483010	09.08.2016.	4,5	Мелез
14	CS 7122184084	09.08.2016.	9	Мелез
15	RS 7165483011	09.08.2016.	5	Мелез
16	RS 7194146505	15.08.2016.	6,5	Холштајн-фризијска
17	RS 7143493457	15.08.2016.	7	Сименталска
18	RS 7163392099	15.08.2016.	7	Холштајн-фризијска
19	RS7125982751	15.08.2016.	4	Мелез
20	DE0352231555	15.08.2016.	7,5	Холштајн-фризијска

**Вакцинисане краве код којих је узорковање вршено 105 дана након вакцинације.**

<b>Редни број</b>	<b>ID краве</b>	<b>Датум вакцинације</b>	<b>Старост (година)</b>	<b>Раса</b>
1	RS 7114146137	03.08.2016.	5,5	Холштајн-фризијска
2	RS 7195754831	03.08.2016	2	Холштајн-фризијска
3	RS 7105733089	03.08.2016.	2	Сименталска
4	RS 7104318799	03.08.2016.	4	Холштајн-фризијска
5	RS 7154318589	03.08.2016.	5	Холштајн-фризијска
6	RS 7183827411	02.08.2016.	6	Холштајн-фризијска
7	RS 7114400289	02.08.2016.	4,5	Холштајн-фризијска
8	RS 7184400224	02.08.2016.	4,5	Холштајн-фризијска
9	RS 7166498974	02.08.2016.	1,5	Холштајн-фризијска
10	RS 7155556687	02.08.2016.	3	Холштајн-фризијска
11	RS 7144277240	01.08.2016.	4,5	Мелез
12	CS 7191792615	01.08.2016.	10	Холштајн-фризијска
13	RS 7105730712	01.08.2016.	2,5	Холштајн-фризијска
14	RS 7184168885	01.08.2016.	5	Холштајн-фризијска
15	RS 7163826709	01.08.2016.	5,5	Холштајн-фризијска
16	RS 7164318918	03.08.2016.	4	Холштајн-фризијска
17	RS 7144318919	03.08.2016.	4	Холштајн-фризијска
18	RS 7195548134	03.08.2016.	7,5	Холштајн-фризијска
19	RS 7165597183	03.08.2016.	2	Холштајн-фризијска
20	RS 7175231904	03.08.2016.	2,5	Холштајн-фризијска

**Вакцинисане краве код којих је узорковање вршено 120 дана након вакцинације.**

<b>Редни број</b>	<b>ID краве</b>	<b>Датум вакцинације</b>	<b>Старост (година)</b>	<b>Раса</b>
1	RS 7114150332	02.08.2016.	5,5	Холштајн-фризијска
2	RS 7183848376	02.08.2016.	6,5	Холштајн-фризијска
3	RS 7165226682	02.08.2016.	3,5	Холштајн-фризијска
4	RS 7155274904	02.08.2016.	3	Холштајн-фризијска
5	RS 7124317888	02.08.2016.	4,9	Холштајн-фризијска
6	RS 7145256632	02.08.2016.	4	Холштајн-фризијска
7	RS 7175266677	02.08.2016.	3,5	Холштајн-фризијска
8	RS 7105273718	02.08.2016.	2,9	Холштајн-фризијска
9	RS 7144318052	02.08.2016.	4,8	Холштајн-фризијска
10	RS 7114149881	02.08.2016.	5,7	Холштајн-фризијска
11	RS 7105263955	02.08.2016.	3,5	Холштајн-фризијска
12	RS 7195273733	02.08.2016.	2,9	Холштајн-фризијска
13	RS 7125279743	29.07.2016.	2,4	Холштајн-фризијска
14	RS 7115278536	02.08.2016.	2,5	Холштајн-фризијска
15	RS 7171684730	01.08.2016.	10,4	Холштајн-фризијска
16	RS 7193420350	02.08.2016.	7,5	Холштајн-фризијска
17	RS 7105268180	02.08.2016.	3,2	Холштајн-фризијска
18	RS 7154317518	02.08.2016.	5	Холштајн-фризијска
19	RS 7144318071	02.08.2016.	4,7	Холштајн-фризијска
20	RS 7155266353	02.08.2016.	3,4	Холштајн-фризијска

### 9.3. Прилог 3. Технологија узгоја телади на Фарми 1

1. **Назив и седиште фарме:** АД Војводина у стечају, 26232 Старчево, Панчевачки пут 10

2. **Број крава (приближно):** 320

3. **Технологија узгоја телади:**

**3.1 Исхрана колострумом у првих 48 сати после рођења**

3.1.1 Напајањем, води се рачуна да теле добије колострум своје мајке

**3.2 Исхрана телади у неонаталном периоду**

3.2.1 Дневна количина млека: 6 литара

3.2.2 Дневна фреквенција напајања (2 или 3 пута дневно): два пута дневно

**3.3 Смештај телади до залучења**

3.3.1 Индивидуални - у првих две недеље, па онда групно држање

3.3.2 Групни (број телади у групи-боксу) до 20 телади у групном боксу.

**3.4 Узраст телади при залучењу: 4 месеца**

**3.5 Наставак узгоја телади до узраста од 6 месеци (укратко-описно)**

По залучењу се женска грла пребацују у објекат где се врши одгој приплодних јуница. То је обично са око 4,5 до 5 месеци старости. Мушка грла се продају у старости од 2,5 до 4 месеца старости, што зависи од стечајног управника и државне агенције јер су у стечају, а мушка грла се не тове. Док су грла у групним боксевима хране се сувом детелином и концентрованим оброком. Када се пребаце у објекат за одгој приплодних јуница тада у оброк иде и део силиране целе стабљике кукуруза. И код групних боксева и у одгоју јуница постоје испусти који се користе током целе године, сем лоших услова у зимском делу године. Фарма је затвореног типа и нема уласка грла на ову фарму. На фарми су грла холштај фризијске и сименталске расе, која се заједно држе, према старосним категоријама.

## 9.4. Прилог 4. Технологија узгоја теледи на Фарми 2

1. Назив и седиште фарме: ПИК „Бечеј“ А.Д. РЈ „Говедарство“ ОЈ „Ново Село“

2. Број крава (приближно): 608

3. **Технологија узгоја теледи:**

3.1 **Исхрана колострумом у првих 48 сати после рођења**

3.1.1 Напајањем + (од своје мајке)

3.2 **Исхрана теледи у неонаталном периоду**

3.2.1 Дневна количина млека: 4 l

3.2.2 Дневна фреквенција напајања (2 или 3 пута дневно): 2 пута

3.3 **Смештај теледи до залучења**

3.3.1 Индивидуални – женска телад

3.3.2 Групни (број теледи у групи-боксу): мушка телад – 15 теледи у боксу

3.4 **Узраст теледи при залучењу:** 2 месеца мушка грла, 3 месеца женска грла.

Сва телад се напајају само млеком, а не заменама за млеко.

3.5 **Наставак узгоја теледи до узраста од 6 месеци (укратко-описно) :**

Телад се држе у великим корлатима од 3-6 месеци групно, раздвојени по половима. Једна половина корлата је наткривена и тај део се услављава. Услављавање се врши најмање једном недељно, по потреби и чешће, а чишћење тврдог дела корлата два пута недељно. У једном корлату се смешта 60-80 теледи. Епизоотиолошки је неповољно јер се на једном месту држе телад различитог узраста. Телад се хране из миксерице, а концентровани део obroка од 2,5 kg се умеша у миксерицу. Храна им се нуди преко хранидбених столова. Добијају и 3 kg сена луцерке или ливадског сена. Напајање водом је из валова капацитета 1500 l. У овом периоду им се у воду или путем хране додаје мултивитамински комплекс 2 пута месечно у трајању од 5 дана. Телад се, у случају обољења терапирају у корлатима јер не постоји могућност издвајања оболелих грла у засебне обекте. Телад најчешће оболевају од бронхопнеумоније различите етиологије, затим обољења локомоторног система (најчешће узроковани падом животиње) и ређе акутни надун бурага. Сезонско обољење у зимском и почетком пролећног периода је и трихофиција. Током боравка у прва два месеца мери им се телесна маса и контролише дневни прираст (једанпут месечно). Животиње које имају мањи прираст се након мерења издвајају и терапирају парентерално мултивитаминским комплексима.

**9.5. Прилог 5. Подаци о вакцинисаним кравима и њиховој теледи на Фарми 1 и Фарми 2.**

<b>Фарма 1</b>			
<b>Редни број</b>	<b>ID краве</b>	<b>Датум тељења</b>	<b>ID телета</b>
<b>1</b>	RS 7114286156	07.09.2017.	RS 7186961081
<b>2</b>	RS 7172651272	08.09.2017.	RS 7196961085
<b>3</b>	RS 7125211215	20.09.2017.	RS 7106961099
<b>4</b>	RS 7135540372	28.09.2017.	RS 7106961155
<b>5</b>	RS 7144510093	26.09.2017.	RS 7136961154
<b>6</b>	RS 7143874739	16.09.2017.	RS 7156961092
<b>7</b>	RS 7145540404	25.09.2017.	RS 7156961153
<b>8</b>	RS 7145540480	30.09.2017.	RS 7146961158
<b>9</b>	RS 7154509923	25.09.2017.	RS 7176961152
<b>10</b>	RS 7164394525	19.09.2017.	RS 7166961157
<b>11</b>	RS 7173874733	14.09.2017.	RS 7196961090
<b>12</b>	RS 7184508597	01.10.2017.	RS 7126961159
<b>13</b>	RS 7165702810	06.10.2017.	RS 7166961162
<b>14</b>	RS 7104509888	09.10.2017.	RS 7146961163
<b>15</b>	RS 7113651735	17.09.2017.	RS 7146961097



---

**Фарма 2**

Редни број	ID краве	Датум тељења	ID телета
1	RS 7105265624	07.01.2018.	RS 7124969313
2	RS 7124884352	10.01.2018.	RS 7154969321
3	RS 7194041495	11.01.2018.	RS 7164969325
4	RS 7124851629	12.01.2018.	RS 7124969327
5	RS 7124841790	14.01.2018.	RS 7144969331
6	RS 7144866026	14.01.2018.	RS 7124969332
7	RS 7155260290	15.01.2018.	RS 7154969335
8	RS 7105272498	16.01.2018.	RS 7134969336
9	RS 7135272604	19.01.2018.	RS 7114969342
10	RS 7115265732	21.01.2018.	RS 7174969344
11	RS 7145260295	22.01.2018.	RS 7104969347
12	RS 7144866031	24.01.2018.	RS 7104969352
13	RS 7125265703	26.01.2018.	RS 7154969359
14	RS 7194851796	26.01.2018.	RS 7174969358
15	RS 7124537102	31.01.2018.	RS 7104969366

---