

Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Milovan M. Milovanović

Ispitivanje imunskog odgovora i prisustva
vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog
dermatitisa kod goveda i novorođene teladi nakon
vakcinacije atenuiranom vakcinom

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

University of Belgrade
Faculty of veterinary medicine

Milovan M. Milovanović

**Examination of immune response, and the
presence of vaccine and field strain of nodular
dermatitis virus in cattle and new borne calves
after vaccination with attenuated vaccine**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR 1:

dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

MENTOR 2:

dr Vesna Milićević, naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Miroslav Valčić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr Jakov Nišavić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Doktorska disertacija pod naslovom: „Ispitivanje imunskog odgovora i prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa kod goveda i novorođene teladi nakon vakcinacije atenuiranom vakcinom“ je realizovana u okviru projekata „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (broj projekta TR31088) kojim rukovodi prof. dr Sonja Radojičić i projekta „Ekološka i virusološka istraživanja prisustva emerging zoonoza u rezervatima prirode Republike Srbije“ (broj projekta TR37015) kojim rukovodi prof. dr Miroslav Valčić, koji su finansirani od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i u okviru DAAD stipendije (Nemačka služba za akademsku razmenu) kratki istraživački boravci.

Ispitivanje imunskog odgovora i prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa kod goveda i novorođene teladi nakon vakcinacije atenuiranom vakcinom

Rezime

Nodularni dermatitis (ND) je akutno, subakutno ili hronično virusno oboljenje goveda i bivola. Prvi slučaj nodularnog dermatitisa u Srbiji je laboratorijski potvrđen 07.06.2016. godine. Najviše žarišta je bilo registrovano u Pčinjskom okrugu. Za sprečavanje širenja bolesti, celokupna populacija goveda je vakcinisana živom atenuiranom vakcinom od Neethling soja (OBP, Južnoafrička Republika). Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje aktivno i pasivno stečenog imunskog odgovora protiv virusa nodularnog dermatitisa kod goveda i novorođene teladi metodom virus neutralizacionog testa (VNT), tehnikom indirektno imunofluorescencije (IFAT) i komercijalnim ID Screen[®] Capripox double antigen Multi-species-ELISA testom proizvođača IDvet (Monpelje, Francuska). Pored seroloških ispitivanja, kod vakcinisanih životinja ispitivano je i prisustvo vakcinalnog i terenskog soja virusa metodom Real-Time PCR.

Materijal za ispitivanje je sakupljen na teritoriji opštine Kraljevo u selu Vrdila, gde nije bilo prijavljenih slučajeva nodularnog dermatitisa. Uzorkovanje je sprovedeno tri puta u toku 2017. godine i to pre revakcinacije, mesec dana nakon revakcinacije i pet meseci nakon revakcinacije. Za ispitivanja aktivnog imunskog odgovora krvni serumi su sakupljeni od 79 životinja pre i mesec dana nakon revakcinacije i od 74 životinje pet meseci nakon revakcinacije. Za utvrđivanje specifičnosti ELISA testa ispitani su krvni serumi od 20 svinja seropozitivnih na *Swipoxvirus*. Pasivni imunski odgovor je ispitan pregledom krvnog seruma i kolostruma od 17 krava (na dan teljenja) i krvnog seruma od 20 teladi (0. i 14. dana starosti). Za ispitivanje karakteristika ELISA testa za ispitivanje mleka sakupljeno je pojedinačno i zbirno mleko od krava u laktaciji i to od 52 krave sa 12 gazdinstava pre revakcinacije, od 49 krava sa 11 gazdinstava mesec dana nakon revakcinacije i od 53 krave sa 15 gazdinstava pet meseci nakon revakcinacije. Kao negativna kontrola u cilju validacije ELISA testa ispitano je mleko od 352 krave sa teritorije Savezne Republike Nemačke. Za detekciju prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa prikupljena je krv sa EDTA od životinja odabranih za ispitivanje aktivnog i pasivnog imunskog odgovora, bris nosa i bris usta od životinja odabranih za ispitivanje aktivnog imunskog odgovora i hematofagni insekti sa 20 farmi odabranih za ispitivanje aktivnog imunskog odgovora (uzorkovani 4 puta tokom perioda ispitivanja).

Specifična antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa su dokazana 46/47 nedelja nakon vakcinacije kod 27 životinja (35,06%) korišćenjem virus neutralizacionog testa i kod 26 životinja (33,77%) testom indirektno imunofluorescencije i ELISA testom. Iako su posle revakcinacije broj pozitivnih životinja i titar antitela porasli, kod jednog broja životinja nije došlo do serokonverzije.

Rezultati virus neutralizacionog testa su korišćeni za izračunavanje osetljivosti i specifičnosti ELISA testa i testa indirektno imunofluorescencije. Osetljivost ELISA test je iznosila 91%, a specifičnost 87% dok su karakteristike testa indirektno imunofluorescencije 85% osetljivost i 86% specifičnost. Niže vrednosti ELISA testa dobijene su poređenjem sa rezultatima dobijenim testom indirektno imunofluorescencije i iznosile su osetljivost 88%, a specifičnost 76%.

Krvni serum svinja seropozitivnih na *Suipoxvirus* reagovali su negativno na ELISA testu, a detektovane S/P% vrednosti su iznosile 0 i 1.

Ispitivanjem kolostruma ELISA testom, u 52,94% uzoraka je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa. Kod 81,82% teladi čije su majke imale antitela u kolostrumu, 14. dana starosti detektovana su antitela u krvnom serumu komercijalnim ELISA testom.

Ispitivanje uzoraka mleka ELISA testom rađeno je korišćenjem protokola proizvođača za krvni serum i plazmu i modifikacijom protokola. Za postavljeni uslov maksimalne specifičnosti, najoptimalnija S/P% granična vrednost za ispitane uzorke mleka je bila ≥ 10 . Korišćenjem ove granične vrednosti osetljivost ELISA testa je iznosila 51% protokolom proizvođača i 63% modifikovanim protokolom. U 99,4% uzoraka mleka krava poreklom iz Savezne Republike Nemačke nisu dokazana specifična antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa.

Metodom Real-Time PCR u ispitanim uzorcima nije ustanovljeno prisustvo genoma vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa.

Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji detekcija specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa je moguća 46/47 nedelja nakon vakcinacije. Pored određenog broja seronegativnih životinja nakon revakcinacije je uočen pozitivan efekat revakcinacije. Za ispitivanje aktivnog i pasivnog imunskog odgovora ELISA test se najbolje pokazao. Pored toga što je komercijalni ELISA test namenjen za detekciju specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa iz krvnih seruma i plazme, sa uspehom su detektovana i specifična antitela protiv virusa

nodularnog dermatitisa u mleku i kolostrumu. Odsustvo detekcije nukleinske kiseline vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa dodatno opravdava primenu vakcinalne kampanje.

Ključne reči: aktivni imunski odgovor, pasivni imunski odgovor, virus neutralizacioni test, test indirektno imunofluorescencije, ELISA test, nodularni dermatitis, serum, mleko, kolostrum

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

UDK broj: 578 : 616-022 : 636.2

Examination of immune response, and the presence of vaccine and field strain of nodular dermatitis virus in cattle and new borne calves after vaccination with attenuated vaccine

Summary

Nodular dermatitis (ND) is acute, subacute or chronic viral disease of cattle and buffalo. First laboratory confirmed ND outbreak in Serbia occurred on 07 June 2016. The most of the outbreaks registered was in Pčinjski district. In response to prevent spreading of the disease, vaccination of all cattle population was applied using of live attenuated Neethling vaccine (OBP, South Africa). Goal of this doctoral dissertation was investigation of active and passive acquired immunity against ND in cattle and new-born calves using of virus neutralization test (VNT), indirect fluorescence antibody test (IFAT) and commercially available ID Screen[®] Capripox double antigen Multi-species-ELISA test from IDvet (Montpellier, France). Next to serological investigation, presence of vaccine and field nodular dermatitis virus (NDV) strain was investigated using of Real-Time PCR method.

Material for this study was collected in Vrdila village, Kraljevo municipality area with no previous reported ND outbreaks. Sampling was performed three times in 2017, before re-vaccination, one month post re-vaccination and five months post re-vaccination. For serological investigation of active acquired immunity blood serum samples were collected out of 79 cattle before and one month post re-vaccination and out of 74 cattle five months post re-vaccination. Blood serum samples from 20 swine seropositive to *Suipoxvirus* were used for investigation of ELISA specificity. Passive acquired immunity was investigated from blood serum and colostrums samples out of 17 cows (on day of calving) and from blood serum samples out of 20 new-born calves (0 and 14 days old). For investigation of characteristics of ELISA test for milk samples, individual and bulk milk samples were collected from cows which were in lactation, out of 52 cows and 12 farms before re-vaccination, 49 cows and 11 farms one month after re-vaccination and out of 53 cows and 15 farms five months post re-vaccination. As for negative control with the aim of ELISA test validation, milk samples out of 352 cows from Germany were investigated. For investigation of presence of vaccine and field NDV EDTA blood from animals which were selected for investigation of active and passive acquired immunity, nasal swabs and mouth swabs from

animals which were selected for investigation of active acquired immunity and hematophagous insects from 20 farms were collected (four times during study).

ND-specific antibodies were detected 46/47 weeks after vaccination in 27 animals (35.06%) using of virus neutralization test and in 26 animals (33.77%) using of indirect fluorescent antibody test and ELISA tests. Even though increase of number of seropositive animals and titer of antibody after re-vaccination was detected, one number of animals didn't seroconvert.

Results of virus neutralization test were used as referent for determination of sensitivity and specificity of ELISA and indirect fluorescence antibody test. Sensitivity of ELISA test was determined to be 91% with specificity of 87%, while the characteristics of indirect fluorescence antibody test were 85% sensitivity and 86% specificity. Lower values of ELISA test were obtained comparing to indirect fluorescence antibody test which were sensitivity 88% and specificity 76%.

Blood serum samples from swine seropositive on *Suipoxvirus* reacted negative on ELISA with detected S/P% values of 0 and 1.

Investigating colostrum samples with ELISA, ND-specific antibodies were detected in 52,94% samples. Detection of ND-specific antibodies was in 81.82% serum samples from calves which mothers had detectable antibodies in colostrums, at 14 days old with commercially ELISA.

Investigation of milk samples with ELISA was performed with manufacture protocol for serum and plasma and with modified protocol. Using of maximal specificity in ROC analysis, most appropriate cut off value for milk samples was determined to be $S/P\% \geq 10$. Using of this cut off value, sensitivity of ELISA test was 51% for results obtained with manufacture protocol and 63% for results obtained with modified protocol. In 99.4% of investigated milk samples from cows from Germany were not detected ND-specific antibodies.

Using of Real-Time PCR method in investigated samples wasn't detected presence of genome of vaccine and field NDV strain.

According to obtained results in this study detection of ND-specific antibodies was possible 46/47 weeks after vaccination. Despite certain number of seronegative detected animals after re-vaccination positive effect of re-vaccination was noticed. For investigation of active or passive acquired immunity ELISA test shows to be most suitable. Despite that commercially ELISA test has

designed for detection of ND-specific antibodies in blood serum and plasma, with great success ND-specific antibodies were detected in milk and colostrum. Absence of detection of nucleic acid of vaccine and field NDV strain in investigated samples, justifies the use of vaccination campaign.

Key words: active immune response, passive immune response, VNT, IFAT, ELISA, ND, serum, milk, colostrum

Science area: Veterinary Medicine

Field area: Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDK: 578 : 616-022 : 636.2

Sadržaj

1	Uvod.....	1
2	Pregled literature.....	4
2.1	Istorijat.....	4
2.2	Morfološke karakteristike virusa.....	4
2.3	Raširenost.....	5
2.4	Prenošenje virusa.....	6
2.5	Patogeneza.....	8
2.6	Klinička slika.....	8
2.7	Patomorfološke promene.....	10
2.8	Dijagnostika.....	11
2.9	Imunitet.....	15
2.10	Mere kontrole i eradikacije.....	16
3	Ciljevi i zadaci.....	22
4	Materijal i metode.....	23
4.1	Materijal.....	23
4.2	Metode.....	26
5	Rezultati.....	38
5.1	Rezultati ispitivanja aktivnog imunskog odgovora.....	38
5.2	Rezultati ispitivanja karakteristika ELISA testa za ispitivanje seruma.....	44
5.3	Rezultati ispitivanja pasivnog imunskog odgovora.....	44
5.4	Rezultati ispitivanja karakteristika ELISA testa za ispitivanje mleka.....	46
5.5	Real-Time PCR.....	54
6	Diskusija.....	56
7	Zaključci.....	64
8	Literatura.....	66

1 Uvod

Kao bolest od velikog ekonomskog značaja, nodularni dermatitis se nalazi na listi bolesti obaveznih za prijavljivanje Svetske organizacije za zdravlje životinja (OIE). Nakon pojave bolesti u Turskoj 2013. godine, virus nodularnog dermatitisa je za kratko vreme uspeo da se proširi u pravcu Evrope i u pravcu Azije nanoseći velike direktne i indirektne ekonomske gubitke. Danas se smatra da virus nodularnog dermatitisa predstavlja najveću pretnju govedarskoj proizvodnji u Evropi.

Jedan od načina suzbijanja širenja i kontrole bolesti je i sprovođenje preventivne vakcinacije svih prijemčivih životinja. Efikasnost vakcinacije zavisi od mnogih faktora. Tokom sprovođenja vakcinalne kampanje od veterinara se očekuje da u kratkom vremenskom roku vakcinišu veliki broj životinja, pa je neminovno da se dešavaju propusti kao što su: vakcinacija životinja koje su u inkubaciji, neadekvatno skladištenje vakcina, nepoštovanje hladnog lanca, inaktivacija vakcine izlaganjem direktnom sunčevom svetlu, nepravilno doziranje vakcine, nepravilna aplikacija vakcine, vakcinacija mladih životinja ispod šest meseci starosti zbog mogućeg postojanja materanih antitela. Pored propusta, česte su i stručne greške od kojih je najčešća upotreba iste igle za vakcinaciju velikog broja životinja.

Nodularni dermatitis (ND) je akutno, subakutno ili hronično virusno oboljenje goveda i bivola. Uzročnik pripada familiji *Poxviridae*, podfamiliji *Capripoxvirinae* i rodu *Capripoxvirus* u koji su svrstani i virus boginja ovaca (SPPV) i virus boginja koza (GTPV). Nodularni dermatitis je enzootska bolest u većini afričkih zemalja, ali se od 2013. godine progresivno širio ka Bliskom Istoku, južnoj Evropi, oblasti Kavkaza, Rusiji i Kazahstanu.

Virus nodularnog dermatitisa je veoma otporan u spoljašnjoj sredini: na temperaturi od 4 °C može da preživi do šest meseci, na temperaturi od 37 °C preživljava do pet dana dok u osušanim krastama ostaje vijabilan i do 35 dana.

Izvor virusa u prirodi su obolele životinje odnosno noduli i kraste u kojima se nalazi velika koncentracija virusa. Pored toga, virus nodularnog dermatitisa se iz inficirane životinje izlučuje pljuvačkom, iscetkom iz nosa i oka i spermom. Tokom viremije koja traje od 7 do 21 dan, virus nodularnog dermatitisa se nalazi u krvi u značajno nižem titru nego u samim nodulima. Na pojavu i širenje infekcije utiču i kišni periodi kada je povećan broj hematofagnih insekata. Smatra se da virus nodularnog dermatitisa mehanički prenose komarci (*Culex minificens* i *Aedes natrionus*), muve (*Stomoxys*

calcitrans i *Biomys fasciata*) i krpelji (*Rhipicephalus appendiculatus* i *Amblyomma hebraeum*). Infekcija može nastati i ingestijom kontaminirane hrane i vode. Transport inficiranih životinja, naročito onih u inkubaciji, se smatra najvažnijim putem širenja bolesti na velike udaljenosti. Direktni kontakt između životinja nema značaja u prenošenju virusa nodularnog dermatitisa.

Nakon ulaska u organizam, najčešće inokulacijom preko vektora, virus se replikuje u dermisu. Period inkubacije traje od 1 do 4 nedelje. Klinička slika nodularnog dermatitisa kod inficiranih goveda se kreće od blage do veoma teške sa smrtnim ishodom.

U većini slučajeva prvi znaci bolesti su pojačano suženje, povišena telesna temperatura (40-41 °C), gubitak apetita i pad proizvodnje mleka. Preskapularni i prekruralni limfni čvorovi su višestruko uvećani. Nakon pojave povišene telesne temperature, pojavljuju se noduli po koži, oivičeni uskim hiperemičnim pojasom, dok je dlaka iznad promenjene kože nakostrešena. Broj nodula na oboleloj životinji varira od svega nekoliko do generalizovane forme kada su opisane promene prisutne po celom telu kao i unutrašnjim organima. Noduli se najčešće uočavaju na područjima koja su slabo obrasla dlakom. U kasnijim stadijumima bolesti noduli nekrotizuju, pri čemu nekroza zahvata i potkožno tkivo, a u izuzetnim slučajevima i mišićno tkivo. Promene na sluznicama su slične, ali su praćene brzim razvojem ulceracija koje su uzrok pojačane salivacije i suženja. Lezije mogu biti prisutne u larinksu, farinksu, plućima i duž digestivnog sistema. Kod nekih životinja dolazi do razvoja edema jednog ili više ekstremiteta i pojave hromosti. Kod bikova se može pojaviti prolazni ili trajni sterilitet, a kod gravidnih krava pobačaji. Oporavak obolelih životinja traje veoma dugo, a s obzirom na to da noduli zahvataju tkivo do supkutisa, ožiljci i perforacije u koži ostaju trajno. Životinje koje prebole infekciju stvaraju imunitet koji je u većoj meri baziran na ćelijski posredovanom u odnosu na humoralni imunski odgovor. Stepenn morbiditeta varira u zavisnosti od imunskog statusa domaćina i prisustva vektora i najčešće se kreće između 5% i 45%. Stepenn mortaliteta je obično nizak i kreće se između 1% i 3%, ali u nekim slučajevima može dostići i 10%.

Dijagnostika nodularnog dermatitisa se vrši na osnovu karakterističnih kliničkih znakova i potvrđuje izolacijom virusa na kulturi tkiva i identifikacijom virusa primenom različitih molekularnih metoda. Detekcija specifičnih antitela se vrši upotrebom seroloških metoda.

Štete koje nastaju usled pojave ove bolesti su izuzetnih razmera, a posledica su eutanazije i neškodljivog uklanjanja obolelih životinja, pada proizvodnje mleka, pobačaja, steriliteta, zabrane prometa, zabrane izvoza živih životinja, proizvoda, semena, embriona itd. Najznačajnije mere koje se

koriste u cilju suzbijanja nodularnog dermatitisa podrazumevaju humano ubijanje zaraženih i životinja u kontaktu kao i vakcinaciju svih prijemčivih životinja.

Prvi slučaj nodularnog dermatitisa u Srbiji dokazan je u junu 2016. godine. Najveći broj žarišta je bio registrovan u Pčinjskom okrugu. Za suzbijanje bolesti primenjena je eutanazija i neškodljivo uklanjanje obolelih i životinja u kontaktu, podizanje biosigurnosnih mera, dezinsekcija, kontrola kretanja životinja i vakcinacija celokupne populacije goveda.

U cilju utvrđivanja efikasnosti vakcinacije protiv nodularnog dermatitisa u Srbiji, odnosno utvrđivanja seroprevalencije kod vakcinisanih životinja sa područja slobodnog od nodularnog dermatitisa, serološkim metodama je ispitano prisustvo i visina titra specifičnih antitela. Pored toga, molekularnim testovima je ispitano prisustvo vakcinalnog i terenskog soja virusa u vakcinisanoj populaciji goveda.

S obzirom na to da su podaci o vakcinaciji i kvalitetu imunskog odgovora goveda protiv nodularnog dermatitisa oskudni, ova istraživanja će doprineti razumevanju kinetike humoralnog imunskog odgovora koji nastaje nakon vakcinacije Neethling sojem virusa. Ispitivanjem teladi ustanovljen je procenat teladi koja su putem kolostruma dobila maternalna antitela kao i korelacija sa titrom antitela u krvnom serumu i kolostrumu majki.

Dobijeni rezultati se mogu koristiti za dokumentovanje efikasnosti vakcinacije i odsustva virusa nodularnog dermatitisa u cilju sticanja slobodnog statusa zemlje od ove bolesti.

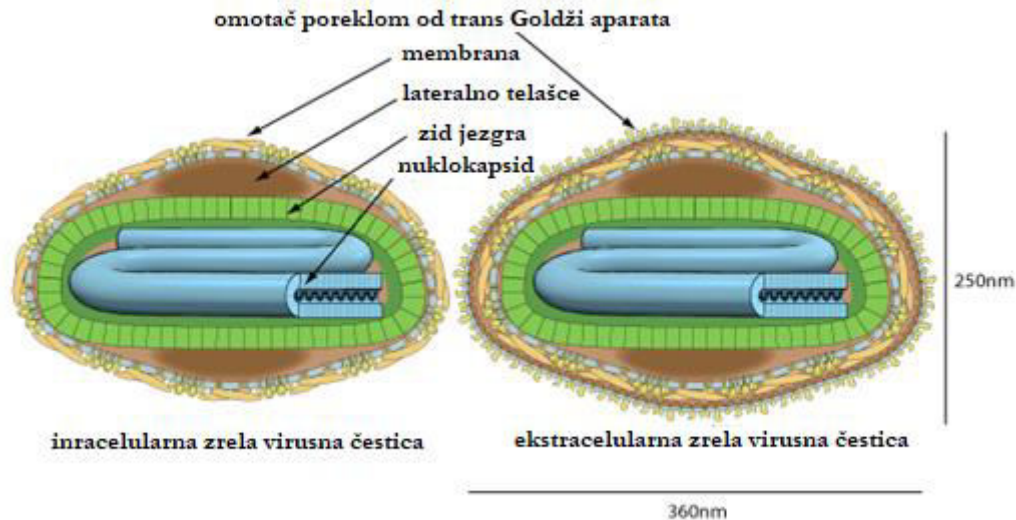
2 Pregled literature

2.1 Istorijat

Davne 1929. godine u severnoj Rodeziji (sadašnjoj Zambiji) po prvi put je registrovan nodularni dermatitis. Iz neznanja, infekcija goveda virusom nodularnog dermatitisa je bila zamenjena sa reakcijom organizma na ubod insekata (Mac-Donald, 1931; Morris, 1931). Prvi klinički znaci i infektivan karakter bolesti su opisani od strane Von Backstroma (1945) nakon pojave bolesti 1943. i 1944. godine u Ngamiland oblasti gde bolest dobija ime Ngamiland bolest goveda. Tokom epizootije u Ngamiland oblasti uočeno je da se ona javlja samo kod goveda i da ne postoji rasna i starosna predispozicija (Von Backstrom, 1945). Thomas i sar. (1945) su prvi eksperimentalno dokazali infektivni karakter bolesti.

2.2 Morfološke karakteristike virusa

Virus nodularnog dermatitisa zajedno sa virusom boginja ovaca i virusom boginja koza spada u rod *Capripoxvirus*, podfamiliju *Chordopoxvirinae*, familiju *Poxviridae* (Buller i sar., 2005). Genetski materijal virusa nodularnog dermatitisa je u formi jednog linearnog, dvostrukog DNK lanca, dugog 150773 bp. Centralni kodirajući region je ograničen sa dva identična obrnuta terminala ponavljanja od po najmanje 2418 bp (Tulman i sar., 2001). Replikacija virusa se odvija u citoplazmi uz formiranje karakterističnih intracitoplazmatskih inkluzionih telašaca (Burdin, 1959; De Lange, 1959; Prozesky i Barnard, 1982). Virusna čestica je oblika cigle, prekrivena kratkim tubularnim elementima, veličine 290 x 270 nm (Kitching i Smale, 1986). Nakon replikacije virus napušta inficiranu ćeliju na dva načina: pupljenjem (spajanjem viroplazme sa citoplazmom) kada nastaju virusne čestice sa omotačem ili lizom ćelije kada nastaju virusne čestice bez omotača (slika 1). Većina virusnih čestica je bez omotača. Iako su obe virusne čestice infektivne, čestice sa omotačem brže i lakše dolaze u kontakt sa neinficiranom ćelijom i ulaze u nju što je povezano sa bržim širenjem virusa u organizmu inficirane životinje (Murphy i sar, 1999). Prototip virusa nodularnog dermatitisa je Neethling virus koji je prvi put izolovan u Južnoafričkoj Republici (Alexander i sar., 1957).



Slika 1. Šematski prikaz capripoksvirusnih čestica (preuzeto sa: <https://viralzone.expasy.org/152>)

Kao i drugi pripadnici familije *Poxviridae*, virus nodularnog dermatitisa je veoma stabilan. Do inaktivacije virusa dolazi pri temperaturama od 55 °C u trajanju od 2 sata, temperaturi od 60 °C u trajanju od 1 sata i na temperaturi od 65 °C u trajanju od 30 minuta. Virus može preživeti u kožnim nodulima 10 godina na -80 °C, kao i u inficiranim kulturama tkiva 6 meseci na 4 °C. Zamrzavanjem i odmrzavanjem virusa ne dolazi do drastičnog pada titra virusa. U rasponu pH od 6,6 do 8,6 i pri temperaturi od 37 °C u trajanju od 5 dana ne dolazi do pada titra virusa. Virus nodularnog dermatitisa je osetljiv na etar (20%), hloroform, formalin (1%) i na neke deterdžente (npr. natrijum dodecyl sulfat). Virus je veoma otporan i u nekrotičnim kožnim nodulima preživljava 33 dana, u sasušanim krastama 35 dana, a u koži sušenoj na vazduhu 18 dana. Virus je osetljiv na direktnu sunčevu svetlost i deterdžente na bazi rastvarača masti (World Organisation for Animal Health (OIE), 2017)

2.3 Raširenost

Nakon prvih opisanih slučajeva, nodularni dermatitis se brzo širio, zahvatajući teritoriju juga afričkog kontinenta i Madagaskar (Weiss, 1968). Širenje bolesti na sever afričkog kontinenta je zabeleženo 1970. godine prijavom bolesti u Sudanu, 1974. godine u Nigeriji i 1977. godine u Tanzaniji, Keniji, Zimbabveu, Somaliji i Kamerunu (Brenner i sar., 2006). Bolest ostaje ograničena na podsaharski deo Afrike sve do maja 1988. godine kada se prvi put pojavljuje u Egiptu, a potom

1989. godine i u Izraelu (Ali i sar., 1990; Yeruham i sar., 1994). Egipat ponovo prijavljuje nodularni dermatitis 2006. godine nakon ilegalnog uvoza inficiranih goveda iz Etiopije (El-Kholy i sar., 2008). Uprkos striktnoj primeni mera kontrole i eradikacije, nodularni dermatitis nastavlja širenje na sever zahvatajući teritoriju Male Azije (Tuppurainen i Oura, 2012). Do sada, nodularni dermatitis nisu prijavile sledeće afričke zemlje: Libija, Alžir, Maroko i Tunis (Tuppurainen, 2018a). U Turskoj se nodularni dermatitis po prvi put pojavio 2013. godine gde se u naredne dve godine proširio na čitavu teritoriju (Timurkan i sar., 2016). Daljim širenjem na sever, nodularnim dermatitisom biva zahvaćena teritorija Azerbejdžana, 2014. godine (Zeynalova i sar., 2016). Širenjem iz smera Turske, nodularni dermatitis se u 2015. godini pojavio u Grčkoj (Tasioudi i sar., 2016). Početkom 2016. godine Bugarska, bivša Jugoslovenska Republika Makedonija, Srbija, Crna Gora i Albanija prijavljuju prve slučajeve ove bolesti na svojim teritorijama (EFSA, 2018). Prvi slučaj nodularnog dermatitisa u Srbiji je zvanično potvrđen 07.06.2016. godine u selu Ljiljance, opština Bujanovac (Vidanović i sar., 2016). Tokom epizootije nodularnog dermatitisa u 2016. godini, u Srbiji je prijavljeno 225 žarišta u kojima je sa kliničkim simptomima obolelo 267 životinja (EFSA, 2017).

2.4 Prenosenje virusa

Mnoge studije su potvrdile da se virus nodularnog dermatitisa prenosi mehanički, putem hematofagnih insekata (Chihota i sar., 2001; Tuppurainen i sar., 2013a). Prva uspešna izolacija virusa nodularnog dermatitisa iz muva (*Stomoxys calcitrans* i *Biomya fasciata*) je izvedena nakon hranjenja insekata na inficiranim životinjama (Weiss, 1968).

Chihota i sar. (2001) su dokazali da komarci vrste *Aedes aegypti* uspešno mogu da prenesu virus nodularnog dermatitisa od 2 do 6 dana nakon hranjenja na inficiranim životinjama. Komarci, hraneći se direktno iz krvnih sudova, predstavljaju idealnu vrstu za prenošenje virusa nodularnog dermatitisa što je eksperimentalno dokazano kao najefikasniji način inficiranja koji dovodi do razvoja generalizovane forme bolesti (Carn i Kitching, 1995a). Prema novijim istraživanjima, detekcija virusne nukleinske kiseline i izolacija virusa je bila uspešna iz *Stomoxys calcitrans* i *Culicoides nubeculosus* odmah nakon hranjenja na inficiranim životinjama. Izolacija virusa nodularnog dermatitisa iz *Anopheles stephensi* je moguća 4 dana, a detekcija nukleinske kiseline 8 dana nakon hranjenja na inficiranoj životinji. Kod vrste *Culex quinquefasciatus*, izolacija virusa nodularnog dermatitisa je moguća 2 dana, a detekcija nukleinske kiseline 6 dana nakon hranjenja na inficiranoj životinji. Međutim, uprkos uspešnoj izolaciji virusa i detekciji nukleinske kiseline, Chihota i sar. (2003) u

eksperimentalnim uslovima nisu uspeli da putem hranjenja ovih insekata na zdravim životinjama dovedu do nastanka infekcije.

Vektorski potencijal krpelja je odavno poznat i do sada je dokazano da mužjaci *Rhipicephalus appendiculatus* mehanički mogu da prenose virus nodularnog dermatitisa sa inficirane na zdravu životinju (Tuppurainen i sar., 2013a). Tuppurainen i sar. (2013a) su pokazali da nakon hranjenja inficiranih krpelja na prijemljivoj životinji dolazi do razvoja viremije 10 dana posle hranjenja uz pojavu otoka kruralnih i preskapularnih limfnih čvorova 6 dana nakon hranjenja. Dokazivanje genoma virusa nodularnog dermatitisa i izolacija virusa uspešno su izvedene iz pljuvačke krpelja vrsta *Rhipicephalus appendiculatus* i *Amblyomma hebraeum* nakon hranjenja na inficiranim životinjama (Lubinga i sar., 2013). Lubinga i sar. (2015) su dokazali da se virus kod krpelja vrste *Amblyomma hebraeum* prenosi transstadijalno, kao i da ova vrsta krpelja virus nodularnog dermatitisa mehaničkim putem može preneti na prijemčive životinje. Isti autori ukazuju i da *Amblyomma hebraeum* može biti potencijalni domaćin za održavanje virusa u prirodi. Pored intra- i transstadijalnog prenošenja, u studiji Tuppurainen i sar. (2013b) je dokazano da ženke krpelja *Rhipicephalus decoloratus* prenose virus nodularnog dermatitisa i transovarijalno, gde je nova generacija larvi dovela do nastanka infekcije kod goveda sa razvojem blage kliničke slike.

Osim putem hematofagnih insekata, nodularni dermatitis se prenosi prilikom prirodnog pripusta i veštačkim osemenjavanjem. Izlučivanje virusa nodularnog dermatitisa u ejakulatu bikova je prvi put opisano od strane Ironsa i sar. (2005) koji su uspeli da genom virusa detektuju u periodu od 6 do 159 dana, i da virus izoluju od 8 do 42 dana nakon infekcije. Annandale i sar. (2010) su dokazali da se virus nodularnog dermatitisa nalazi u svim frakcijama ejakulata kao i da virus kod bikova koji ga prolongirano izlučuju perzistira u testisima i epididimisima. Annandale i sar. (2014) su dokazali da do infekcije junica može doći putem veštačkog osemenjavanja spermom zaraženih bikova kao i embriotransferom. Takođe, opisano je intrauterino vertikalno prenošenje virusa sa inficirane majke na fetus u poslednjoj trećini graviditeta (Rouby i Aboulsoud, 2016). Henning (1956) navodi da se virus nodularnog dermatitisa može preneti sa majke na tele preko mleka.

Prema dosadašnjim saznanjima, virus nodularnog dermatitisa se ne prenosi direktnim kontaktom između životinja. U studiji Carn i Kitching (1995b) eksperimentalno je dokazano da infekcija virusom nodularnog dermatitisa može biti uspešna putem konjunktiva sa razvojem lokalne reakcije i nosne sluznice sa razvojem generalizovane infekcije. Međutim, u studiji Carn i Kitching

(1995a) nije došlo do prenošenja virusa sa inficirane na zdrave životinje direktnim kontaktom pri odsustvu vektora.

2.5 Patogeneza

Prema Babiuku i sar. (2008), tropno tkivo za virus nodularnog dermatitisa je koža. Primarna replikacija virusa se odvija na mestu intradermalne ili supkutane inokulacije što je praćeno otokom regionalnih limfnih čvorova (Weiss, 1968). U slučaju intravenske inokulacije, dolazi do razvoja generalizovane forme bolesti (Carn i Kitching, 1995a). Najveća koncentracija virusa se nalazi u kožnim nodulima. Takođe, relativno visoka koncentracija virusa se nalazi i u nosnom sekretu 15-18 dana nakon infekcije (Babiuk i sar., 2008). Eksperimentalnim studijama je dokazano da viremija traje od 6 do 15 dana (Babiuk i sar., 2008), dok novije studije ukazuju da ona traje nešto duže, od 5 do 21 dana (Dietze i sar., 2018).

Nakon eksperimentalne infekcije, prisustvo genoma virusa nodularnog dermatitisa je dokazano u nosnom sekretu i oralnoj tečnosti do 28 dana posle infekcije (Dietze i sar., 2018), u spermi bikova do 159 dana (Irons i sar., 2005) i kožnim nodulima 42 dana nakon infekcije (Babiuk i sar., 2008). Virus nodularnog dermatitisa se može naći u različitim vrstama ćelija kao što su: keratinociti, epitelne ćelije dlačnog folikula, fibroblasti, histiocitima, supkutisu i limfnim čvorovima i ćelijama endo-, peri- i epimizijuma perifernih nerava (Prozesky i Barnard, 1982; Babiuk i sar., 2008; Awadin i sar., 2011).

2.6 Klinička slika

Nodularni dermatitis može proticati u akutnom, subakutnom i hroničnom toku, a praćen je formiranjem karakterističnih nodula po koži i vidljivim sluznicama kod 16% do 50% prirodno ili eksperimentalno inficiranih životinja (slika 2) (Weiss, 1968; Kitching i Carn., 1995a; Tuppurainen i sar., 2005; Coetzer i sar, 2018). Inkubacioni period kod prirodne infekcije varira i najčešće se kreće između 1 i 4 nedelje (Haig, 1957; Coetzer, 2004). Početak bolesti je praćen povišenjem telesne temperature (40 – 41 °C) i uvećanjem supskapularnih i prekrualnih limfnih čvorova. Ubrzo nakon povišenja telesne temperature kod 16% do 50% životinja dolazi do pojave karakterističnih nodula po koži čiji je broj različit i kreće se od nekoliko do generalizovane forme kada su noduli prisutni po celom telu. Noduli su tvrde, cirkumskriptne kožne promene, izdignute iznad ravni kože i jasno ograničene od okolne zdrave kože (Weiss, 1968; Carn i Kitching, 1995a; Tuppurainen i sar., 2005). Mogu biti različite veličine, ali najčešće su dimenzija od 0,5 do 5 cm (OIE, 2017). Kod nekih

životinja može doći do pojave ulceroznih promena na sluzokoži konjunktiva, usne i nosne šupljine usled čega dolazi do pojačane lakrimacije, salivacije i pojave iscetka iz nosa (Prozesky i Barnard, 1982; Carn i Kitching, 1995b; Coetzer, 2004; Babiuk i sar., 2008). Predilekciona mesta za pojavu nodula su predeo glave i vrata, vime, skrotum, vulva i perineum (slika 3) (Coetzer, 2004). Noduli u krajnjoj fazi nekrotizuju, a nekrotične promene na koži su duboke i zarastaju stvaranjem ožiljka (Prozesky i Barnard, 1982). Promene se, takođe, mogu naći i na unutrašnjim organima, na ždredu, larinksu, traheji, plućima i duž digestivnog sistema (Babiuk i sar., 2008).



Slika 2. Karakterističan izgled nodula na koži levo i sluzokoži desno, Srbija 2016. godine (foto M. Milovanović, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija i Specijalistički veterinarski institut „Kraljevo“, Kraljevo, Srbija; Projekat TR 31088)

Gravidne krave mogu da pobace ili može doći do intrauterinog prenošenja virusa na plod (Rouby i Aboulsoud, 2016). Kod inficiranih bikova može se javiti trajni ili prolazni sterilitet. Oporavak životinja teče sporo, posebno ukoliko dođe do nastanka sekundarnih bakterijskih infekcija odnosno pneumonija i mastitisa. Morbiditet se kreće od 5% do 45%, dok je mortalitet generalno nizak i kreće se od 1% do 3%, a izuzetno dostiže 10% (Coetzer i sar., 2018).



Slika 3. Predilekciona mesta pojave nodula nakon prirodne infekcije goveda, Srbija 2016. godine (foto M. Milovanović, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija i Specijalistički veterinarski institut „Kraljevo“, Kraljevo, Srbija; Projekat TR 31088)

2.7 Patomorfološke promene

Makroskopske promene koje se uočavaju u dermisu i epidermisu, se ponekad protežu i do, supkutanog i mišićnog tkiva. Na poprečnom preseku nodula, u akutnom i subakutnom toku bolesti, noduli su kremaste ili bele boje. Dve nedelje nakon pojave nodula dolazi do ulceracije nodula sa uzdignućem centralnog dela takozvanog „*sit-fast*“ (OIE, 2017).

Patohistološki, kod akutne forme bolesti prisutni su vaskulitis i limfangitis praćeni trombozom i infarktima u koži koji dovode do edema i nekroze. Nekrotična područja su infiltrirana neutrofilima, makrofagima i ponekad eozinofilima. Ove ćelije postepeno zamenjuju limfoblasti, limfociti, plazma ćelije, makrofagi i fibroblasti. Kod starijih procesa dolazi do stvaranja ožiljnog tkiva uz perivaskularno nakupljanje ćelija. U epidermisu dolazi do akantoze, parakeratoze i hipokeratoze. Keratinociti su uvećani i suđerastog izgleda. Kao posledica lize nekrotičnih ćelija nastaje intercelularni edem i formiranje vezikula (Prozesky i Barnard, 1982).

Promene u vidu erozija i ulceracija se mogu naći na sluzokoži usta, ždrela, nosne šupljine, larinksa i traheje. Noduli ili druge promene se mogu naći u digestivnom sistemu (pogotovo u sirištu), vimenu i plućima. Ponekad se promene mogu naći na mokraćnoj bešici, bubrezima, vagini i testisima. Promene prisutne u plućima se teško uočavaju i najčešće su u vidu fokalne atelektaze i edema. Kod nekih životinja je uočeno prisustvo sinovitisa i tendosinovitisa (The Center for Food Security & Public Health, 2017).

Hiperplazija i hipersekrecija seroznih i mukoznih žlezda primećena je u usnoj šupljini i gornjim partijama respiratornog sistema. Regionalni limfni čvorovi su edematozni, sa limfoidnom hiperplazijom folikularne i interfolikularne zone. U sinusima limfnih čvorova uočava se infiltracija limfoblastima, limfocitima i makrofagima sa hipertrofijom i hiperplazijom retikuloendotelijalnih ćelija. Takođe, može se uočiti negnojna intersticijalna pneumonija i negnojni meningoencefalitis (Prozesky i Barnard, 1982).

Kod bikova noduli se mogu naći na koži skrotuma i repu epididimisa. Uvećanje skrotuma je uočljivo u akutnom toku, dok u kasnijem stadijumu bolesti testisi imaju normalnu veličinu ili se smanjuju. Nekrotična, fibrinozna i područja zahvaćena infarktima se mogu naći u tkivu testisa i epididimisa (Annandale i sar., 2010)

2.8 Dijagnostika

Sumnja na nodularni dermatitis se zasniva na karakterističnoj kliničkoj slici, ali se definitivna dijagnoza postavlja primenom različitih laboratorijskih metoda. Laboratorijska dijagnostika nodularnog dermatitisa se vrši izolacijom virusa na kulturi tkiva (Babiuk i sar., 2007; OIE, 2017), dokazivanjem virusa putem elektronskog mikroskopa (OIE, 2017) ili utvrđivanjem prisustva genoma virusa metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR) (Ireland i Binopal, 1998; Heine i sar., 1999; Tuppurainen i sar., 2005; Orlova i sar., 2006). Kod blage kliničke slike gde noduli nisu jasno izraženi može se opravdano posumnjati na druge bolesti ili uzročnike. Alergijske reakcije i reakcije na ubod insekata ili krpelja kao i urtikarija i fotosenzitivnost mogu dovesti do sličnih promena (Baibiuk, 2018). Nekoliko virusnih infekcija, takođe, može dovesti do promena na koži od kojih su najvažnije infekcije parapoksvirusima (bovini papularni stomatitis i lažne boginje), ortopoksvirusima (vakcinija i virus boginja goveda) i herpesvirusima (goveđi herpes virus 2 koji izaziva ulcerozni mamilitis) (Brenner i sar., 2009; Babiuk, 2018). Upotreba žive vakcine može dovesti do pojave takozvane „Neethling bolesti“ koja se karakteriše pojavom nodula po koži, manjih

dimenzija u odnosu na one nastale prirodnom infekcijom (Ben-Gera i sar., 2015; Debeljak i sar., 2017). Takođe, treba isključiti i bolesti bakterijske etiologije kao što je kožni oblik tuberkuloze, pseudotuberkulozu, i kožne promene nastale kao posledica parazitskih infekcija kao što su *Hypoderma bovis*, onhocerkoza izazvana sa *Onchocerca ochengi* (u Africi) ili besnoitioza izazvana protozooom *Besnoitia besnoiti* (Babiuk, 2018).

2.8.1 Uzorci za dijagnostiku

Najbolji uzorci za dokazivanje virusa nodularnog dermatitisa su kožni noduli, kraste, pljuvačka ili nosni bris, krv sa antikoagulansom (EDTA) (Tuppurainen i sar., 2017a), sperma (Irons i sar., 2005) i mleko (Bedeković i sar., 2017). Za serološka ispitivanja koristi se krvni serum (Tuppurainen i sar., 2017a).

Transport uzoraka se obavlja u hladnom lancu. Uzorke krvi, briseva i tkiva je potrebno transportovati na temperaturi od 2 do 6 °C ukoliko transport traje do 48 sati. Ukoliko je transport duži od 48 sati treba ih transportovati na -20 °C. Uzorke krvnih seruma treba transportovati na temperaturi od 2 do 8 °C ukoliko transport traje do 5 dana. Ukoliko transport traje duže od 5 dana, izdvojiti krvni serum i transportovati ga na -20 °C (Tuppurainen i sar., 2017a).

2.8.2 Detekcija virusa nodularnog dermatitisa

2.8.2.1 Izolacija virusa

Primarne i kontinuirane kulture tkiva poreklom od goveda, ovaca i koza se koriste za izolaciju virusa nodularnog dermatitisa. Primarna ili sekundarna kultura tkiva kože goveda ili testisa jagnjeta se smatraju najprijemčivijim za izolaciju virusa (Babiuk i sar., 2007; OIE, 2017). Nakon inokulacije materijala, virus ulazi u ćelije fuzijom sa ćelijskom membranom (Moss, 2006). Usled replikacije virusa u citoplazmi uočava se citopatogeni efekat (CPE) u vidu smežuravanja ćelijske membrane, zaokrugljivanjem i odvajanja inficiranih ćelija od ostalih zdravih ćelija. Prvi CPE u vidu malih polja se može videti 2 dana nakon inokulacije materijala, za 4 do 6 dana dolazi do stvaranja većih polja, dok nakon 14 dana inkubacije dolazi do potpunog uništavanja ćelija (OIE, 2017). Takođe, virus nodularnog dermatitisa se može izolovati na kokošijim embrionima (Van Rooyen i sar., 1969) i ćelijama bubrega afričkog zelenog majmuna (African green monkey kidney cells – Vero), ali se ovaj način ne preporučuje za primarnu izolaciju (OIE, 2017).

2.8.2.2 *Elektronska mikroskopija*

Metodom negativnog bojenja i upotrebom elektronskog mikroskopa mogu se u citoplazmi jasno uočiti virioni karakteristični za poksviruse (Kitching i Smale, 1986). Virion capripoksvirusa se ne može razlikovati od viriona orthopoksvirusa (vakcinija virusa i boginja goveda). Od parapoksvirusa koji izazivaju bovini papularni stomatitis i lažne boginje goveda, capripoksvirusi se morfološki razlikuju jer su manji, ovalnog oblika i prekriveni slojem tubulina koji se kao omotač nalazi oko viriona. Virus nodularnog dermatitisa na kulturi tkiva dovodi do formiranja intracitoplazmatskih inkluzija što predstavlja osnovnu razliku u odnosu na ulcerozni mamilitis koga izaziva herpes virus 2 goveda, koji dovodi do stvaranja intranuklearnih inkluzija i sincicijuma (OIE, 2017).

2.8.2.3 *Molekularne metode*

Molekularne metode, koje su danas sve više u upotrebi u odnosu na klasične omogućavaju jednostavno, brzo i lako utvrđivanje prisustva virusa. Različiti konvencionalni i Real-Time PCR protokoli su razvijeni u cilju detekcije capripoksvirusa, ali i za razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva.

2.8.2.3.1 PCR

Konvencionalna PCR metoda predstavlja jednostavnu, osjetljivu i brzu metodu detekcije virusnog genoma. Do danas u upotrebi su tri protokola koji su bazirani na detekciji P32 proteina capripoksvirusa (Ireland i Binopal, 1998; Heine i sar., 1999; Tuppurainen i sar., 2005).

2.8.2.3.2 Real-Time PCR (qPCR)

Detekcija nukleinske kiseline capripoksvirusa metodom Real-Time PCR opisana je od strane Balinskog i sar, (2008) i Bowdena i sar, (2008). Stubbs i sar., (2012) su izvršili validaciju protokola razvijenog od strane Bowdena i sar, (2008) za detekciju P32 capripoksvirusa.

2.8.2.3.3 PCR za tipizaciju capripoksvirusa i PCR za razlikovanje terenskog od vakcinalnog soja virusa nodularnog dermatitisa (Differentiating Infected from Vaccinated Animals - DIVA)

Razlikovanje virusa nodularnog dermatitisa, virusa boginja ovaca i virusa boginja koza Real-Time PCR metodom opisano je od strane Lamien i sar. (2011) i Le Goff i sar. (2009). DIVA PCR za razlikovanje vakcinalnog od terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa dizajniran je na osnovu delecije 27 baznih parova (bp) na poziciji 116363 vakcinalnog virusa u odnosu na terenski soj

(Menasherow i sar., 2014, 2016). Nakon pojave nodularnog dermatitisa u Srbiji, dizajniran je i opisan Real-Time PCR protokol za detekciju lokalnog terenskog soja (Vidanović i sar., 2016). Takođe, grčki istraživači su dizajnirali sličan protokol za razlikovanje vakcinalnog od terenskog soja virusa (Agianniotaki i sar., 2017).

2.8.2.3.4 Sekvenciranje

U cilju molekularne karakterizacije virusa, ceo ili delovi genoma virusa se mogu sekvencirati (Babiuk, 2018).

2.8.3 Detekcija specifičnih antitela

Serološki testovi za dokazivanje specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa kod prirodno inficiranih ili vakcinisanih životinja su: virus neutralizacioni test, test indirektno imunofluorescencije, agar gel imunodifuzioni test, Western blot (OIE, 2017) i ELISA test.

2.8.3.1 Virus neutralizacioni test (VNT)

Virus neutralizacioni test je jedini validovani test za detekciju antitela protiv capripoksvirusa (OIE, 2017). Test se smatra visoko specifičnim, ali ne toliko osetljivim. Najbolji rezultati i uvid u imunski status goveda se može odrediti ukoliko se test radi dva puta, pre i posle vakcinacije, dok se za dijagnostiku kliničkih slučajeva bolesti koristi porast titra antitela u drugom, parnom serumu (OIE, 2017).

2.8.3.2 Test indirektno imunofluorescencije (IFAT)

Test indirektno imunofluorescencije predstavlja alternativni serološki test (Gari i sar., 2008). Test je visoko osetljiv, ali ne i specifičan jer je moguća unakrsna reaktivnost sa antitelima protiv virusa bovinog papularnog stomatitisa i virusa lažnih boginja goveda (Davies i Otema, 1981; OIE, 2017).

2.8.3.3 Agar gel imunodifuzioni test (AGID)

Iako se navodi u OIE priručniku, agar gel imunodifuzioni test se ne preporučuje za serološku dijagnostiku nodularnog dermatitisa s obzirom na unakrsnu reaktivnost sa antitelima protiv virusa bovinog papularnog stomatitisa i virusa lažnih boginja goveda (OIE, 2017).

2.8.3.4 Western blot

Western blot predstavlja najosetljiviji i najspecifičniji test za detekciju antitela protiv strukturnih proteina virusa nodularnog dermatitisa, ali je test skup i komplikovan za izvođenje. Korišćenjem imunoblota, pozitivni rezultat se dobija na proteine molekulske težine 67, 32, 26, 19 i

17 kDa koji predstavljaju glavne strukturne proteine capripoksvirusa. Hiperimuni serum na parapoksviruse (virus bovinog papularnog stomatitisa ili virus lažnih boginja goveda) reagovaće na neke od navedenih proteina, ali će izostati reakcija sa proteinom od 32 kDa koji je specifičan samo za capripoksviruse (OIE, 2017).

2.8.3.5 ELISA

Do sada je opisano nekoliko ELISA protokola za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa. Prvi dizajniran indirektni ELISA test je bio zasnovan na upotrebi P32 proteina umnoženog u *E. coli* kao antigena za detekciju specifičnih antitela kod goveda (Carn i sar, 1994) i za detekciju antitela protiv capripoksvirusa kod ovaca (Heine i sar, 1999). Međutim, ovako dobijen antigen nije bio dovoljno stabilan. Isti antigen su koristili i Babiuk i sar. (2009) kada su dizajnirali ELISA test, ali je P32 bio dobijen od virusa boginja ovaca inaktivisanog toplotom. Ovako dobijen antigen je pokazivao bolje karakteristike, ali je njegova priprema komplikovana i ekonomski neisplativa. Osetljivost ovog ELISA testa je bila niža u odnosu na virus neutralizacioni test, jer je njime bilo moguće detektovati specifična antitela samo kod životinja sa izraženom kliničkom slikom bolesti (Babiuk i sar., 2009). Danas postoji samo jedan komercijalno dostupan ELISA test za detekciju specifičnih antitela protiv capripoksvirusa ID Screen® Capripox double antigen Multi-species-ELISA test proizvođača IDvet (Monpelje, Francuska).

2.9 Imunitet

Iako je imunski odgovor na capripoksviruse pre svega ćelijski posredovan, važnu ulogu igraju i specifična antitela. Antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa koja se mogu detektovati već od 2. dana nakon pojave kliničkih simptoma, ostaju u merljivom titru oko 7 meseci. Titar antitela u značajnoj meri raste 21. i 42. dana od početka infekcije (OIE, 2017). Ukoliko životinja ispolji blagu kliničku sliku, doći će do razvoja slabog imunskog odgovora (Bowden i sar., 2009). U studiji Kitchinga (1986) dokazano je da nakon davanja krvnog seruma imune ovce samo antitela mogu sprečiti infekciju patogenim capripoksvirusom kod ovaca.

Za sada ne postoje podaci koje sve ćelije učestvuju u razvoju imunskog odgovora kod infekcije virusom nodularnog dermatitisa. Ćelijski posredovan imunski odgovor je dobro opisan ispitivanjem drugih poksvirus infekcija. Efikasnost ćelijski posredovanog imunskog odgovora u ranim fazama infekcije podrazumeva aktivaciju ćelija koje pripadaju urođenom sistemu odbrane poput ćelija prirodnih ubica (NK) i efektorskih T ćelija poput citotoksičnih T limfocita. Uloga ovih ćelija je u

brzom prepoznavanju i eliminaciji inficiranih ćelija kako bi se sprečilo umnožavanje i širenje virusa. Sintezom raznih virokina i viroceptora poksvirusi vrše modulaciju ekstracelularnog prostora inficirane ćelije i na taj način dovode do maskiranja infekcije u ranim fazama. Virokini i viroceptori koje sintetišu poksvirusi utiču na komplement, citokine i hemokine. Pored modulacije ekstracelularnog prostora, poksvirusi vrše i promene u intracelularnom prostoru gde dovode do inhibicije apoptoze, interferona i signaliziranja interleukinu 1 β R (IL-1 β R) (Seet i sar., 2003).

Uloga CD4 i CD8 T limfocita i B limfocita dobro je opisana kod miševa nakon infekcije ectromelia virusom. Ispitivanjem sekundarnog imunskog odgovora miševa inficiranih ectromelia virusom dokazano je da su miševi kod kojih je vršena supresija B limfocita podložni infekciji. Međutim, miševi kod kojih je vršena supresija CD8 T limfocita bili su zaštićeni od reinfekcije (Panchanathan i sar., 2006). U studiji Chaudhri i sar. (2006) zaključeno je da kod miševa, kod kojih je suprimirana B limfocitna loza može doći do razvoja perzistentne infekcije ectromelia virusom. Za sada ne postoje slične studije na govedima.

2.10 Mere kontrole i eradikacije

Kao bolest od velikog ekonomskog interesa, nodularni dermatitis se nalazi na listi bolesti obaveznih za prijavljivanje Svetske organizacije za zdravlje životinja (OIE). Sjedinjene Američke Države su svrstale virus nodularnog dermatitisa u potencijalne agense za agroterrorizam. Kod pojave bolesti obavezna je primena mera za kontrolu i eradikaciju, ne samo na nivou gazdinstva (farme) odnosno žarišta već i na nivou države i regiona. Mere koje se primenjuju na gazdinstvu u slučaju pojave bolesti obuhvataju eutanaziju i neškodljivo uklanjanje obolelih i životinja koje su bile u kontaktu sa obolelom, dezinfekciju i dezinsekciju. Takođe, formira se zaraženi krug prečnika 3 km od centra žarišta i ugroženi krug čiji prečnik iznosi 10 km (Council directive 92/119/EEC, 1992). Prestanak mera na zaraženim gazdinstvima, zaraženom i ugroženom krugu donosi nadležni veterinarski inspektor, ukoliko su prošla dva najduža inkubaciona perioda (56 dana) od pojave poslednjeg slučaja i ukoliko je vakcinacija svih prijemčivih životinja u zaraženom i ugroženom krugu (osim novorođene teladi) sprovedena pre više od 28 dana (Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu, 2016a). Mere kontrole i eradikacije bolesti obuhvataju: vakcinaciju svih prijemčivih životinja, kontrolu kretanja životinja, neškodljivo ubijanje i uklanjanje leševa („*stamping out*“ metoda), kontrolu vektora, dezinfekciju prostorija gde su držane inficirane životinje i aktivnu prisotru (Tuppurainen i sar., 2018b).

2.10.1 Vakcinacija

Kao mera kontrole širenja nodularnog dermatitisa može se sprovesti i vakcinacija svih prijemčivih goveda živom atenuiranom vakcinom (Kitching i sar., 1987; Kitching, 2003; Tuppurainen i sar., 2014; Gari i sar., 2015). Pretpostavlja se da je supstitucija od 438 aminokiselina u lancu DNK vakcinalnog virusa odgovorna za atenuaciju (Kara i sar., 2003). Postoji samo jedan serotip capripoksvirusa koji je zajednički za virus nodularnog dermatitisa, virus boginja ovaca i virus boginja koza jer je nukleotidna sličnost između izolata 96% (Tulman i sar., 2001, 2002). Upotrebom jednog virusa za vakcinaciju, postiže se unakrsna zaštita na druge capripoksviruse (Kitching, 2003). Trenutno su na tržištu za vakcinaciju goveda protiv nodularnog dermatitisa dostupne atenuirane homologne i heterologne vakcine. Atenuiranim homolognim vakcinama pripada prototip virusa nodularnog dermatitisa soj Neethling i soj KSGPV O-240 ranije okarakterisan kao virus boginja ovaca (Kitching, 2003; Tuppurainen i sar., 2014). Atenuiranim heterolognim vakcinama pripada virus boginja ovaca RM65, rumunski soj virusa boginja ovaca i Gorgan virus boginja koza (Kitching i sar., 1987; Kitching, 2003; Gari i sar., 2015). U zemljama slobodnim od boginja ovaca i boginja koza, zabranjena je upotreba heterologne vakcine za imunizaciju goveda protiv nodularnog dermatitisa (Tuppurainen i Oura, 2012).

Neželjeni efekti koji nastaju upotrebom atenuirane vakcine su: otok na mestu aplikacije, pojava sitnih nodula po koži od nekoliko do generalizovane forme, prolazno smanjenje proizvodnje mleka, povišenje telesne temperature, smanjenje apetita i pobačaji (Brenner i sar., 2009; Katsoulos i sar., 2017; Debeljak i sar., 2017; Abutarbush i Tuppurainen, 2018).

Katsoulos i sar., (2017) su detaljno opisali neželjene efekte koji se javljaju nakon upotrebe homolognog Neethling soja za vakcinaciju goveda. Na mestu aplikacije vakcine došlo je do pojave mekog otoka veličine 15x20 cm 6. dana nakon vakcinacije koji se povukao 10. dana nakon vakcinacije. Pored lokalnog otoka došlo je i do pojave karakterističnih sitnih nodula po koži 8 do 18 dana nakon vakcinacije. Prosečna veličina nodula bila je <0,5 cm, a u pojedinim slučajevima i do 2 cm. Promene su se povukle u roku od 9 do 12 dana, a neke tek 28 dana nakon vakcinacije. Dvofazni pad proizvodnje mleka zabeležen je kod određenog broja vakcinisanih životinja. Prvi pad proizvodnje mleka je zabeležen 4. dana nakon vakcinacije sa vraćanjem na prvobitan nivo posle 2 dana, dok je drugi pad zabeležen između 6. i 12. dana nakon vakcinacije sa postepenim povećanjem proizvodnje mleka 12. dana nakon vakcinacije i vraćanjem na prvobitan nivo 28. dana nakon vakcinacije.

Takođe, Abutarbush i Tuppurainen, (2018) su opisali pojavu neželjenih efekata kod jednog broja goveda vakcinisanih heterolognim sojem RM65. Na mestu aplikacije vakcine došlo je do pojave otoka, pojave karakterističnih čvorića po koži, pada proizvodnje mleka, povišenja telesne temperature, smanjenja apetita i pobačaja. Promene na koži su se javile 7 do 17 dana nakon vakcinacije, a nestajale su nakon 11 do 17 dana. Maksimalna veličina nodula je iznosila 2 cm. Nagli pad proizvodnje mleka registrovan je nedelju dana nakon vakcinacije; laktacija se vraćala na početni nivo 5 nedelja nakon vakcinacije. Povišenje telesne temperature nije prelazilo 39,5 °C, a abortus je zabeležen 24. dana nakon vakcinacije kod jedne krave.

Vakcinacija u Republici Srbiji je započeta nakon dijagnostikovanja nodularnog dermatitisa i zvanične prijave prvog žarišta u zemlji. Za imunizaciju životinja je korišćena vakcina formulisana od Neethling soja proizvođača Onderstepoort Biological Products iz Južnoafričke Republike. Vakcinalna kampanja je zvanično započeta 24.6.2016. godine i trajala je do 30.8.2016. godine. U ovom periodu je vakcinisano 100% životinja (EFSA, 2017). Vakcinacija je nastavljena do kraja godine vakcinisanjem životinja iz uvoza. Vakcinalna kampanja u 2016. godini je sprovedena deljenjem države u tri zone. Zona A, zaražena zona, je obuhvatala Pčinjski i Jablanički okrug gde je vakcinacija sprovedena prstenasto od spolja ka unutra. Zona B, zona pod rizikom, je obuhvatala Borski, Rasinski, Raški, Pirotski, Nišavski, Toplički, Zaječarski i delove Moravičkog i Zlatiborskog okruga dok je zona V obuhvatala sve ostale okruge. Tokom vakcinalne kampanje zabeležena je i pojava neželjenih efekata. Najčešća postvakcinalna reakcija je bila pojava difuznog testastog otoka dimenzija 10x30 cm, na mestu aplikacije vakcine, otoka đerdana i otoka potkožnog tkiva prednjih ekstremiteta, što je dovodilo do prolazne hromosti. Pored lokalnog otoka, zabeležena je i pojava karakterističnih kožnih nodula veličine zrna graška do veličine lešnika najčešće lokalizovanih u predelu vrata, leđa, grudnog koša i ekstremiteta. Prolazni pad proizvodnje mleka iznosio je najčešće oko 20% i trajao je 2 do 3 dana, a retko i duže. Konjunktivitis sa posledičnim slepilom se retko javljao (Debeljak i sar., 2017). Revakcinacija i vakcinacija svih prijemčivih životinja je nastavljena u 2017. i 2018. godini.

Vakcinalna šema u 2016. godini podrazumevala je vakcinaciju novorođene teladi poreklom od nevakcinisanih majki kao i teladi rođenih do 28 dana posle vakcinacije majki, prvog dana posle rođenja. Vakcinacija teladi poreklom od majki koje su se otelile 28 ili više dana nakon vakcinacije sprovodila se 4 – 6 meseci nakon rođenja (Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu, 2016b).

2.10.2 Zabrana kretanja životinja

Sa aspekta supkliničkih infekcija i životinja u inkubaciji, transport predstavlja najveći rizik za širenje zaraze na velike udaljenosti u kratkom vremenskom periodu (Carn i Kitching, 1995a). Jedan od primera prenošenja zaraze je pojava bolesti u Egiptu 2006. godine nakon uvoza inficiranih goveda iz Etiopije (El-Kholy i sar., 2008). Kao metoda kontrole u Srbiji je 2016. godine pored primene vakcinacije u cilju sprečavanja širenja nodularnog deramtitisa Uprava za veterinu je donela zabranu okupljanja goveda na sajmovima, izložbama, stočnim pijacama i dogonima stoke (Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu, 2016c)

2.10.3 Stamping out

Prema preporuci Svetske organizacije za zdravlje životinja, *stamping out* podrazumeva humano ubijanje inficiranih životinja i životinja u kontaktu, kao i životinja iz drugih stada ukoliko je bilo direktnog ili indirektnog kontakta sa inficiranim životinjama (OIE, 2018). Pored humanog ubijanja sprovodi se i neškodljivo uklanjanje leševa, proizvoda poreklom od inficiranih životinja, dezinfekcija i dezinsekcija prostorija.

Činjenica da u mnogim nerazvijenim zemljama većina farmera poseduje ne više od 10 životinja ukazuje na socio-ekonomski značaj ove metode suzbijanja zaraze (FAO, 2017).

Pri donošenju odluke o primeni *stamping out* metode potrebno je razmotriti više faktora kao što su:

- Faza epizootije u trenutku otkrivanja bolesti
- Demografska i politička situacija u regionu (zemlji) zahvaćenoj nodularnim dermatitisom
- Cena koštanja primene *stamping out* u odnosu na korist
- Primena manje radikalnog pristupa upotrebom delimičnog *stamping out* metoda (eutanzije samo životinja sa generalizovanom formom bolesti) (Klement, 2018)

Pozitivni efekti delimičnog *stamping out* metoda uz primenu, karantina i vakcinacije goveda su uočeni u Izraelu 2006. i 2007. godine. Pored toga, u Izraelu, nakon pojave bolesti 2012. godine, nije primenjivan *stamping out* već samo vakcinacija upotrebom heterologne vakcine RM65. Ipak, bolest je uspešno iskorenjena tek 2013. godine kada je, pored RM65 vakcine, korišćena homologna vakcina formulisana od Neethling soja virusa (Ben-Gera i sar., 2015).

Za vreme epizootije u Srbiji *stamping out* je sproveden kako pre, tako i nakon početka vakcinacije. Pre vakcinacije, ubijane su sve životinje u stadu u kojem je bar jedna životinja obolela sa kliničkim simptomima i kod koje je bolest laboratorijski potvrđena. Nakon završene vakcinacije vršena je eutanazija samo klinički obolelih goveda, odnosno samo onih za koje je laboratorijski potvrđeno da su obolele od nodularnog dermatitisa. Ostale životinje u stadu su stavljane pod aktivnu prismotru (Vidanović i sar., 2016).

2.10.4 Kontrola vektora

Kontrola vektora predstavlja jednu od karika u lancu za uspešnu kontrolu i eradikaciju nodularnog dermatitisa. Kontrola vektora na farmama dovodi do smanjenja mogućnosti mehaničkog prenošenja virusa. Mehanički način kontrole vektora na farmama podrazumeva upotrebu mrežica protiv muva i komaraca (Tuppurainen i sar., 2017a). Pored mehaničkih načina kontrole vektora na farmama, goveda se mogu tretirati nekim od „*poure on*“ preparata koji deluju kao insekticidi i kao repelenti. Ovi preparati se mogu uspešno koristiti kod goveda koja se gaje u zatvorenom prostoru i na paši. Međutim, kod upotrebe ovih preparata je propisana karenca za meso i mleko.

Upotreba insekticida kako na farmama tako i zaprašivanjem iz vazduha narušava prirodnu ravnotežu štetno delujući na pčele i druge korisne insekte (Tuppurainen i sar., 2017a).

Uklanjanje izvora stajace vode i stajskog đubriva kao idealnih mesta za razmnožavanje vektora, uz održavanje dobre higijene u prostorijama gde borave životinje, u velikoj meri dovodi do smanjenja broja insekata, a samim tim i rizika od prenošenja virusa ovim putem (Tuppurainen i sar., 2017a).

Najbolji efekti kontrole vektora se dobijaju ukoliko se koriste sve gore navedene metode. Insekticidi imaju najveći efekat ukoliko se koriste pre sezone vektora kada se koriste preparati koji deluju na razvojne i na odrasle oblike (Gottlieb, 2018).

2.10.5 Aktivna i pasivna prismotra

Aktivna i pasivna prismotra imaju za cilj dokazivanje odsustva bolesti, ranu detekciju prisustva i distribucije bolesti kako bi se na vreme preduzele mere propisane zakonom. Mogućnost prepoznavanja kliničkih znakova nodularnog dermatitisa kao i osnovnih puteva prenošenja virusa jedan su od osnovnih uslova uspešnog sprovođenja aktivne i delimično pasivne prismotre. Edukaciju o značaju nodularnog dermatitisa treba usmeriti prema veterinarskim službama, studentima veterinarskog fakulteta, farmerima i njihovim radnicima, trgovcima živim životinjama i njihovim

radnicima kao i radnicima na klanicama. U cilju edukacije potrebno je: sprovoditi obuke, praviti informativne brošure, postere i plasirati informaciju putem medija. Pored ranog otkrivanja bolesti na osnovu kliničkih znakova aktivna i pasivna prisмотра moraju biti potpomognuti laboratorijskom dijagnostikom (Tuppurainen, 2018c).

Laboratorijska dijagnostika podrazumeva primenu seroloških i molekularnih metoda.

Serološka dijagnostika treba biti dobro isplanirana prevashodno zbog ograničenog poluživota specifičnih antitela, ali i zbog nemogućnosti razlikovanja vakcinisanih od inficiranih životinja, s obzirom na to da dostupne vakcine nisu razvijene u skladu sa DIVA strategijom, kao i da svi pripadnici capripoksvirusa reaguju unakrsno serološki. Serološka dijagnostika ima najveći značaj u pograničnim delovima zemalja i u područjima pod rizikom jer omogućava otkrivanje neprimećenih ili neprijavljenih slučajeva. Dokazivanje prisustva specifičnih antitela protiv capripoksvirusa kod goveda, ovaca i koza postalo je jednostavnije nakon što se 2017. godine na tržištu pojavio ELISA test. U zemljama koje imaju status „slobodne sa vakcinacijom“, ELISA test je idealan za ispitivanje prisustva specifičnih antitela u zonama pod nadzorom, odnosno izvan zone vakcinacije. Takođe, ELISA test se može koristiti i za ispitivanje prisustva specifičnih antitela kod goveda u prometu, mada je idealno kombinovati ga sa molekularnim metodama kako bi se otkrile viremične i inficirane asimptomatske životinje (Tuppurainen, 2018c).

Molekularne metode su veoma osetljive i pouzdane za otkrivanje viremičnih i inficiranih asimptomatskih životinja koje moraju biti što pre uklonjene jer predstavljaju izvor zaraze. Ukoliko se za vakcinaciju koristi homologna vakcina i ukoliko dođe do ispoljavanja karakterističnih kliničkih znakova bolesti kod vakcinisanih goveda, potrebno je koristiti PCR metodu kojom se mogu razlikovati vakcinalni od terenskog soja virusa (Menasherow i sar., 2014, 2016; Agianniotaki i sar., 2017). U zemljama u kojima je dozvoljeno korišćenje heterologne vakcine, ukoliko dođe do ispoljavanja karakterističnih kliničkih znakova bolesti kod vakcinisanih goveda potrebno je koristiti PCR za razlikovanje ovih virusa (Le Goff i sar., 2009; Lamien i sar., 2011; Gelaye i sar., 2013).

3 Ciljevi i zadaci

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

Ispitivanje aktivno i pasivno stečenog humoralnog imuniteta nakon vakcinacije atenuiranom vakcinom protiv nodularnog dermatitisa setom različitih seroloških testova (virus neutralizacionim testom, testom indirektne imunofluorescencije i komercijalnim ELISA testom) u krvnom serumu, mleku i kolostrumu. Utvrđivanje eventualnog prisustva vakcinalnog i/ili terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa molekularnim testovima u različitim uzorcima poreklom od ispitujućih životinja kao i hematofagnih insekata potencijalnih mehaničkih vektora virusa iz okruženja.

U cilju realizacije postavljenih ciljeva definisani su sledeći zadaci:

1. Prikupljanje podataka o vakcinaciji životinja, prethodnim žarištima i odabir farmi sa područja na kojima nodularni dermatitis nije dijagnostikovao, a na kojima će se vršiti uzorkovanje.
2. Uzorkovanje krvi, mleka i briseva nosa i usta od vakcinisanih goveda trokratno, tokom jedne godine (prvo uzorkovanje pre revakcinacije, drugo mesec dana nakon revakcinacije i treće pet meseci nakon revakcinacije); uzorkovanje krvi i kolostruma od krava, jednokratno, na dan teljenja i krvi novorođene teladi, dvokratno, pre uzimanja kolostruma i sa 14 dana starosti. Takođe će se izvršiti uzorkovanje hematofagnih insekata i krpelja sa farmi na kojima su boravile životinje.
3. Priprema i skladištenje uzoraka: krvni serum, krv sa EDTA, uzorci mleka i kolostruma biće konzervirani upotrebom 1% natrijum azida. Uzorci će se skladištiti na -20 °C do ispitivanja.
4. Ispitivanje krvnih seruma na prisustvo specifičnih antitela metodom virus neutralizacionog testa, indirektne imunofluorescencije i komercijalnim ELISA testom (ID Screen Capripox double antigen Multi-species, Francuska).
5. Ispitivanje uzoraka mleka na prisustvo specifičnih antitela komercijalnim ELISA testom (ID Screeen Capripox double antigen Multi-species, Francuska).
6. Utvrđivanje karakteristika ELISA testa (ID Screeen Capripox double antigen Multi-species, Francuska) ispitivanjem uzoraka mleka krava sa teritorije Savezne Republike Nemačke i ispitivanjem uzoraka svinja seropozitivnih na *Suipoxvirus*.
7. Utvrđivanje prisustva genoma virusa nodularnog dermatitisa metodom Real-Time PCR u ispitivanim uzorcima (krv, brisevi) kao i prikupljenim hematofagnim insektima.
8. Analiza i statistička obrada rezultata.

4 Materijal i metode

4.1 Materijal

4.1.1 Uzorci za ispitivanje aktivnog imunskog odgovora

4.1.1.1 *Odabir mesta, gazdinstava i broja životinja*

Uzorci za ispitivanje su uzeti u selu Vrdila, teritorija opštine Kraljevo, gde nije bilo slučajeva nodularnog dermatitisa. Odabrano je 79 goveda različitih starosnih kategorija (od 9 meseci do 10 godina), sa 20 gazdinstava radi utvrđivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa nakon vakcinacije i revakcinacije. Vakcinacija goveda u 2016. godini je izvršena atenuiranom vakcinom Neethling soja proizvođača Onderstepoort Biological Products iz Južnoafričke Republike, dok je za revakcinaciju u 2017. godini korišćena atenuirana vakcina takođe Neethling soja BOVIVAX LSD-N proizvođača M.C.I. Sante Animale iz Maroka.

4.1.1.2 *Vremenski period uzorkovanja*

Uzorkovanje je sprovedeno trokratno u toku 2017. godine i to pre revakcinacije, mesec dana nakon revakcinacije i pet meseci nakon revakcinacije. Pri svakoj poseti gazdinstvima uzimana je anamneza od vlasnika, te vršen klinički pregled životinja od kojih su uzimani uzorci. Klinički pregled je bio baziran na otkrivanju karakterističnih kožnih nodula, vidljivih ili palpabilnih, kao i drugih nespecifičnih kliničkih znakova bolesti.

4.1.1.3 *Uzorci i način uzorkovanja*

Prema unapred utvrđenom planu, uzorkovana je krv punkcijom repne vene (*V. coccigea*) u vakutajneru bez antikoagulansa zapremine 7 ml (BD Vacutainertm Lot. 4055269 (Belliver Industrial Estate, UK)).

4.1.2 Uzorci za ispitivanje karakteristika ELISA testa za ispitivanje seruma

Krvni serumi od 20 svinja seropozitivnih na *Suipoxvirus* poreklom sa Firdrih Lefler Instituta su korišćeni za ispitivanje specifičnosti komercijalnog ID Screen[®] Capripox double antigen Multi-species-ELISA testa proizvođača IDvet (Monpelje, Francuska).

4.1.3 Uzorci za ispitivanje pasivnog imunskog odgovora

4.1.3.1 *Odabir mesta, farmi i broja životinja*

Za ispitivanje pasivnog imunskog odgovora, odabrane su dve mini farme muznih goveda u istom selu, sa dobrim biosigurnosnim merama i farmskim menadžmentom. Ukupno je odabrano 17 steonih krava sa terminom teljenja tri i pet meseci nakon revakcinacije u 2017. godini i 20 njihovih

tek rođenih teladi. Za svaku kravu je od vlasnika uzeta anamneza i detaljna istorija zdravstvenog stanja kako bi se otkrili potencijalni faktori koji bi negativno mogli uticati na transfer kolostralnih antitela.

4.1.3.2 Vremenski period uzorkovanja

Uzorkovanje krvnog seruma kod teladi je organizovano dvokratno: prvo uzorkovanje je sprovedeno na dan teljenja (pre uzimanja kolostruma), a drugo sa 14 dana starosti. Pored uzoraka prikupljenih od teladi, uzorkovanje od majki (krvni serum i kolostrum) organizovano je jednokratno na dan teljenja.

4.1.3.3 Uzorci i način uzorkovanja

Od odabranih životinja, prema predviđenom planu prikupljeni su sledeći uzorci: krv bez antikoagulansa i kolostrum. Uzorkovanje krvi majki je sprovedeno kao što je već opisano u 4.1.1.3., a od teladi punkcijom vratne vene (*V. jugularis*). Uzorci kolostruma su sakupljeni u sterilne plastične bočice (Greiner, Srbija) zapremine 15 ml nakon čega je dodat 1% natrijum-azida (NaN_3) kao konzervans.

4.1.4 Uzorci za ispitivanje karakteristika ELISA testa za ispitivanje mleka

4.1.4.1 Uzorci mleka poreklom iz Republike Srbije

Uzorkovanje mleka je sprovedeno od krava odabranih za ispitivanje aktivnog imunskog odgovora koje su bile u laktaciji. Prema vremenskom periodu uzorkovanja, mleko je uzorkovano od 52 krave sa 12 gazdinstava pre revakcinacije, od 49 krava sa 11 gazdinstava mesec dana nakon revakcinacije i 53 krave sa 15 gazdinstava pet meseci nakon revakcinacije. Uzorci mleka su uzorkovani u plastične bočice (Greiner, Srbija) zapremine 15 ml kao pojedinačni uzorci, ručnom mužom iz svih četvrti vimena. Pored toga, uzorkovano je zbirno mleko (od 2 do 10 krava) iz laktofriza na gazdinstvima. Uzorcima mleka je dodat 1% natrijum-azid (NaN_3) kao konzervans.

4.1.4.2 Uzorci mleka poreklom iz Savezne Republike Nemačke

Pojedinačni uzorci mleka od 352 krave sa teritorije Savezne Republike Nemačke su korišćeni kao negativna kontrola u cilju validacije komercijalnog ID Screen[®] Capripox double antigen Multi-species-ELISA testa proizvođača IDvet (Monpelje, Francuska). Uzorci mleka su ispitivani prema protokolu proizvođača za ispitivanje krvnog seruma i plazme kao i prema modifikovanom protokolu.

4.1.5 Uzorci za ispitivanje prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa

Za ispitivanje prisustva vakcinalnog i terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa uzorkovana je krv sa EDTA, bris nosa i bris usta od goveda odabranih za ispitivanje aktivnog imunskog odgovora, kao i krv sa EDTA od krava i teladi odabranih za ispitivanje pasivnog imunskog odgovora. Uzorke hematofagnih insekata predstavljale su štalske muve (*Stomoxys calcitrans*) koje su sakupljene iz okruženja (štala) pomoću mrežica 10x10 cm. Hematofagni insekti su sakupljani četiri puta: mesec dana nakon revakcinacije, pet meseci nakon revakcinacije i dodatno dva puta između ova dva perioda u vreme najveće aktivnosti hematofagnih insekata (avgust i septembar). Spoljašnjim pregledom životinja nije utvrđeno prisustvo krpelja.

Za uzorkovanje krvi korišćeni su vakutajneri sa EDTA antikoagulansom zapremine 9 ml (Vacuette® tube A170434K (Greiner Bio-One, Austria)) punkcijom repne vene (*V. coccigea*), a od teladi punkcijom vratne vene (*V. jugularis*). Brisevi nosa i usta uzorkovani su sterilnim sintetičkim brisevima (Colpan, Italy) koji su nakon uzorkovanja uronjeni u Dulbeco minimalnu esencijalnu podlogu sa dodatkom Erlovih soli (DMEM: Gibco, SAD), 1% antibiotika (Penicilin 1000 IJ i Streptomycin 10 mg/ml; Sigma, Nemačka) i 1% antimikotika (Amfotericin B; Sigma, Nemačka). Jedan uzorak po farmi činio je zbirni uzorak od 10 muva. Muvama je dodat fosfatni slani pufer (PBS) sa dodatkom 1% antibiotika (Penicilin 1000 IJ i Streptomycin 10 mg/ml; Sigma, Nemačka) i 1% antimikotika (Amfotericin B; Sigma, Nemačka).

4.1.6 Priprema uzoraka

Nakon uzorkovanja, krv bez antikoagulansa je ostavljena na sobnoj temperaturi tri sata kako bi se izdvojio krvni serum. Uzorci su u laboratoriju dostavljeni u ručnom frižideru na 4 °C gde su centrifugirani na 2000 RPM (Revolution per minute) u trajanju od 20 minuta, razliveni u po dve 1,5 ml tubice i skladišteni na -20 °C.

Svi prikupljeni brisevi su, nakon transporta, dobro izmešani i razliveni u po dve 1,5 ml tubice koje su odmah nakon toga zamrznute i čuvane na -20 °C. Uzorci mleka (pojedinačni i zbirni) kao i uzorci kolostruma su razliveni u po dve tubice zapremine 1,5 ml i zamrznute na -20 °C. Pre testiranja svi uzorci mleka (pojedinačni i zbirni) i kolostruma su centrifugirani na 10000 RPM u trajanju od 10 minuta kako bi se izdvojila mlečna mast. Tečni sloj, ispod masti, je korišćen za ispitivanje.

Priprema i skladištenje uzoraka je sprovedeno u laboratoriji Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, dok su serološka i molekularna ispitivanja sprovedena u Fridrih Lefler Institutu (Sdufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems), Savezna Republika Nemačka.

4.2 Metode

4.2.1 Serološki testovi

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa korišćeni su virus neutralizacioni test, test indirektno imunofluorescencije i komercijalni ELISA test (ID Screen Capripox double antigen Multi-species, Francuska).

Za izvođenje virus neutralizacionog testa i testa indirektno imunofluorescencije korišćena je MDBK ćelijska linija (ser. br. 0261, Bio banka FLI, Rims, Nemačka) sa ćelijama starim od 3 do 4 dana, inkubirana na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i virus soja Neethling (Pirbrajt Institut, Pirbrajt, UK). Komplement je u svim uzorcima krvnih seruma koji su ispitivani metodom virus neutralizacionog testa inkubisan na 56 °C u trajanju od 30 minuta. Oba testa su izvedena u 96 bunarskim mikrotitar pločama sa ravnim dnom (Costar[®], Corning, New York, SAD).

4.2.1.1 Virus neutralizacioni test (VNT)

Virus neutralizacioni test se koristi za utvrđivanje prisustva i titra neutralizacionih antitela u ispitujućem serumu. Princip ovog testa se zasniva na direktnoj reakciji antitela, u opadajućem razređenju seruma i virusa konstantnog titra (100TCID₅₀/50 µl) kao antigena. Ispitujući i kontrolni serum su ispitivani u serijskim razređenjima od 1:10 do 1:1280, u triplikatu (slika 4). Pri svakom izvođenju testa, postavljene su kontrola titra radnog razređenja virusa, pozitivni i negativni kontrolni serum (slika 5). Oprema koja je korišćena za izvođenje virus neutralizacionog testa je navedena u tabeli 1.

Tabela 1. Spisak opreme koja je korišćena za izvođenje virus neutralizacionog testa

Naziv opreme	Tip	Proizvođač
Biohazard kabinet	B-(MaxPro)	Berner Flow Safe
CO ₂ inkubator	MCO-19AIC	Sanyo
Invertni mikroskop	TS1000	Nicon
Univerzalna centrifuga sa hlađenjem	5430R	Eppendorf
Termo mikser	-	Eppendorf
Inkubator	Salivis	Thermo centar
Mešalica mikrotitar ploča	Roces 3D digital	IKA

Procedura izvođenja testa:

- Pre početka testa ploče su obeležene i po 50 µl DMEM-a bez fetalnog goveđeg seruma (FBS) je uliveno u sve bunare izuzev bunara u redu A namenjenih ispitivanju seruma.
- U tubice od 1,5 ml uliveno je po 450 µl DMEM-a bez FBS i dodato 50 µl ispitujućeg, pozitivnog i negativnog seruma čime je pripremljeno početno razređenje 1:10.
- Uzorci su dobro izmešani i po 100 µl početnog razređenja seruma uliveno je u red A u tri uzastopna bunara za svaki uzorak (4 ispitujuća seruma po ploči).
- Korišćenjem višekanalne pipete, pripremljena su dvostruka serijska razređenja uzoraka direktno u ploči (1:10 – 1:1280).
- U svaki od bunara sa ispitujućim, pozitivnim i negativnim kontrolnim serumom je dodato po 50 µl radnog razređenja virusa 100 TCID₅₀/50 µl.
- Ploče su zatvorene i dobro promešane u trajanju od 5 minuta, na sobnoj temperaturi na mešalici za ploče. Ploče su potom inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ u trajanju od 2 sata, u kesicama za autoklaviranje.
- Nakon inkubacije od 2 sata, u svaki bunar na ispitujućoj i kontrolnoj ploči je dodato po 100 µl suspenzije ćelija (30000 ćelija/ml). Ploče su, u kesicama za autoklaviranje, inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂.
- Posle 4 dana, ploče su posmatrane pod invertnim mikroskopom radi otkrivanja citopatogenog efekta (CPE). Očitavanje rezultata je vršeno posle 7 dana inkubacije. Titar

antitela se izračunavao po Spearman i Kaerber metodi (Spearman i Kaerber, 1974). Uzorci kod kojih je titar iznosio $\geq 1:10$ su se smatrali pozitivnim.

- Pri svakom izvođenju testa vršena je kontrola radnog razređenja virusa, kao i titra antitela kontrolnih seruma, na zasebnoj ploči. Prvih 6 kolona u kontrolnoj ploči je korišćeno za titraciju radnog razređenja virusa dok je drugih šest kolona korišćeno za titraciju pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma u triplikatu, po već opisanoj proceduri.
- Titracija radnog razređenja virusa:
 - U sterilne tube od 15 ml uliveno je po 4,5 ml DMEM-a bez FBS. U prvu tubu dodato je 500 μ l radnog razređenja virusa ($100\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{l}$) i dobro promešano. Na ovaj način je pripremljeno razređenje 10^{-1} .
 - Zatim su pripremljena desetostruka serijska razređenja od 10^{-1} do 10^{-5} .
 - Po 50 μ l svakog razređenja je uliveno u 8 uzastopnih bunara, nakon čega je dodato 100 μ l suspenzije ćelija (30000 ćelija/ml).
 - Ploča sa kontrolnim serumima i kontrolom radnog razređenja virusa je inkubirana 7 dana na 37°C , u atmosferi sa 5% CO_2 nakon čega je vršeno očitavanje. Rezultati su služili za validaciju izvedenog testa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IS-1 1:10	IS-1 1:10	IS-1 1:10	IS-2 1:10	IS-2 1:10	IS-2 1:10	IS-3 1:10	IS-3 1:10	IS-3 1:10	IS-4 1:10	IS-4 1:10	IS-4 1:10
B	IS-1 1:20	IS-1 1:20	IS-1 1:20	IS-2 1:20	IS-2 1:20	IS-2 1:20	IS-3 1:20	IS-3 1:20	IS-3 1:20	IS-4 1:20	IS-4 1:20	IS-4 1:20
C	IS-1 1:40	IS-1 1:40	IS-1 1:40	IS-2 1:40	IS-2 1:40	IS-2 1:40	IS-3 1:40	IS-3 1:40	IS-3 1:40	IS-4 1:40	IS-4 1:40	IS-4 1:40
D	IS-1 1:80	IS-1 1:80	IS-1 1:80	IS-2 1:80	IS-2 1:80	IS-2 1:80	IS-3 1:80	IS-3 1:80	IS-3 1:80	IS-4 1:80	IS-4 1:80	IS-4 1:80
E	IS-1 1:160	IS-1 1:160	IS-1 1:160	IS-2 1:160	IS-2 1:160	IS-2 1:160	IS-3 1:160	IS-3 1:160	IS-3 1:160	IS-4 1:160	IS-4 1:160	IS-4 1:160
F	IS-1 1:320	IS-1 1:320	IS-1 1:320	IS-2 1:320	IS-2 1:320	IS-2 1:320	IS-3 1:320	IS-3 1:320	IS-3 1:320	IS-4 1:320	IS-4 1:320	IS-4 1:320
G	IS-1 1:640	IS-1 1:640	IS-1 1:640	IS-2 1:640	IS-2 1:640	IS-2 1:640	IS-3 1:640	IS-3 1:640	IS-3 1:640	IS-4 1:640	IS-4 1:640	IS-4 1:640
H	IS-1 1:1280	IS-1 1:1280	IS-1 1:1280	IS-2 1:1280	IS-2 1:1280	IS-2 1:1280	IS-3 1:1280	IS-3 1:1280	IS-3 1:1280	IS-4 1:1280	IS-4 1:1280	IS-4 1:1280
	Ispitivani-serum 1			Ispitivani-serum 2			Ispitivani-serum 3			Ispitivani-serum 4		

Slika 4. Šematski prikaz ploče sa ispitivanim uzorcima krvnih seruma VN testom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:10	poz ser 1:10	poz ser 1:10	neg ser 1:10	neg ser 1:10	neg ser 1:10
B	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:20	poz ser 1:20	poz ser 1:20	neg ser 1:20	neg ser 1:20	neg ser 1:20
C	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:40	poz ser 1:40	poz ser 1:40	neg ser 1:40	neg ser 1:40	neg ser 1:40
D	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:80	poz ser 1:80	poz ser 1:80	neg ser 1:80	neg ser 1:80	neg ser 1:80
E	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:160	poz ser 1:160	poz ser 1:160	neg ser 1:160	neg ser 1:160	neg ser 1:160
F	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:320	poz ser 1:320	poz ser 1:320	neg ser 1:320	neg ser 1:320	neg ser 1:320
G	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:640	poz ser 1:640	poz ser 1:640	neg ser 1:640	neg ser 1:640	neg ser 1:640
H	TV	TV-1	TV-2	TV-3	TV-4	TV-5	poz ser 1:1280	poz ser 1:1280	poz ser 1:1280	neg ser 1:1280	neg ser 1:1280	neg ser 1:1280
	Titracija radnog razređenja virusa						Pozitivan kontrolni krvni serum			Negativan kontrolni krvni serum		

Slika 5. Šematski prikaz ploče sa kontrolnom titracijom radnog razređenja virusa i pozitivnim i negativnim kontrolnim krvnim serumima VN testa

4.2.1.2 Test indirektne imunofluorescencije (IFAT)

Test indirektne imunofluorescencije koji se koristi za utvrđivanje prisustva i titra specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa je zasnovan na imunološkom bojenju kompleksa antigen – antitelo nastalih u reakciji ispitujućeg seruma opadajućeg razređenja i konstantne količine virusa. Kompleksi antigen – antitelo postaju vidljivi nakon dovođenja u reakciju sa antitelima protiv goveđih imunoglobulina klase G (IgG) koja su obeležena fluorescein izotiocijanatom. Test se izvodi u dva koraka. Prvi korak je inokulacija ćelija, a drugi fiksiranje ćelija i ispitivanje seruma testom indirektne imunofluorescencije. Oprema koja je korišćena za izvođenje testa indirektne imunofluorescencije je navedena u tabeli 2.

Tabela 2. Spisak opreme koja je korišćena za izvođenje testa indirektno imunofluorescencije

Naziv opreme	Tip	Proizvođač
Biohazard kabinet	B-(MaxPro)	Berner Flow Safe
CO ₂ inkubator	MCO-19AIC	Sanyo
Invertni mikroskop	TS1000	Nicon
Univerzalna centrifuga sa hlađenjem	5430R	Eppendorf
Termo mikser	-	Eppendorf
Inkubator	Salivis	Thermo centar
Mešalica mikrotitar ploča	Roces 3D digital	IKA
Fluorescentni mikroskop	AXIO	Carl Zeiss

Procedura izvođenja testa:

- Po 100 µl suspenzije ćelija MDBK ćelijske linije (30000 ćelija/ml) u DMEM-u sa 10% FBS je naliveno u svaki bunar 96 bunarske mikrotitar ploče.
- Ploče su inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂, 24 sata, u kesicama za autoklaviranje.
- Nakon jednog dana, ćelije su posmatrane na invertnom mikroskopu radi provere gustine rasta i potencijalne kontaminacije. Ukoliko je gustina rasta ćelija bila 80 – 90% sa jasno vidljivim zdravim ćelijama u različitim fazama deobnog ciklusa, ćelije su inokulisane sa po 100 µl Neethling soja virusa (Institut Pirbrajt, Pirbrajt, UK) titra 100TCID₅₀/50 µl. Inokulisane su sve kolone izuzev prve, pete i devete koje su služile kao kontrola nespecifične reakcije (slika 6).
- Nakon inokulacije, ploče su inkubirane 2 dana na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂, u kesicama za autoklaviranje.
- Nakon 2 dana inkubacije, ploče su posmatrane na invertnom mikroskopu, te ploče na kojima se jasno uočava CPE u inokulisanim kolonama i odsustvo CPE-a u neinokulisanim kolonama su korišćene za dalje izvođenje testa.
- Višekanalnom pipetom je uklonjen DMEM iz svih bunara i ćelije su isprane dva puta sa po 200 µl PBS-a zagrejanog na 37 °C. Pri svakom dodavanju PBS-a, ploče su pažljivo mešane na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, na mešalici za ploče.

- Nakon ispiranja, ćelije su fiksirane sa po 200 μ l mešavine acetona i metanola u odnosu 1:1 ohlađenom na -20 °C u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče.
- Nakon fiksacije, ćelije su isprane sa 200 μ l PBS-a kao što je već opisano.
- Radi povećanja specifičnosti, slobodna mesta na ćelijama za vezivanje antitela su blokirana sa po 100 μ l saponin pufera (0,2% goveđi serumski albumin, 0,1% NaN₃ i 0,05% saponina u PBS-a) u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče.
- Ispitujući, pozitivni i negativni kontrolni serumi su pripremani u tri razređenja 1:40, 1:80 i 1:160 u saponin puferu.
- Po blokiranju ćelija, pufer je odliven, a ploče su osušene energičnim udaranjem o ubrus postavljen na tvrdu podlogu.
- Na pripremljene ćelije je dodato 100 μ l ispitujućeg i kontrolnih seruma u prethodno pripremljenim razređenjima (slika 6). Ploče su zavijene aluminijskom folijom i inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče. Nakon inkubacije, serumi su odliveni i ploče osušene na opisani način.
- Nakon sušenja, ploče su isprane tri puta po 5 minuta; dva puta sa po 200 μ l PBS-a i jednom sa 200 μ l saponin pufera zagrejanog na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče. Nakon svakog odlivanja PBS-a i saponin pufera ploče su osušene na prethodno opisan način.
- Antitela protiv goveđih imunoglobulina klase G pripremljena na kunićima (Anti-Bovine IgG FITC, Sigma Aldrich, SAD) koja su razređena u odnosu 1:400 u saponin puferu su dodata po 100 μ l u svaki bunar. Ploče su zavijene aluminijumskom folijom i inkubirane na sobnoj temperaturi 1 sat uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče. Nakon završene inkubacije antitela su odlivena, a ploče osušene na prethodno opisan način.
- Nakon sušenja, ploče su isprane tri puta, po 5 minuta; dva puta sa po 200 μ l PBS-a i jednom sa 200 μ l saponin pufera zagrejanim na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje na mešalici za ploče. Nakon svakog odlivanja PBS-a i saponin pufera, ploče su osušene na prethodno opisan način.
- Nakon ispiranja, u svaki bunar je dodato po 100 μ l dejonizovane vode. Potom su ploče posmatrane otvorene pod fluorescentnim mikroskopom. Pozitivnom reakcijom se smatrala

pojava jasne zelene fluorescencije pri razređenju 1:40. Poslednje razređenje u kojem je uočena fluorescencija se uzimalo za titar antitela.

	NI*				Inokulisani redovi				NI				Inokulisani redovi			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
A	1:40 IS*-1	1:40 IS-1	1:80 IS-1	1:160 IS-1	1:40 IS-9	1:40 IS-9	1:80 IS-9	1:160 IS-9	1:40 IS-17	1:40 IS-17	1:80 IS-17	1:160 IS-17				
B	1:40 IS-2	1:40 IS-2	1:80 IS-2	1:160 IS-2	1:40 IS-10	1:40 IS-10	1:80 IS-10	1:160 IS-10	1:40 IS-18	1:40 IS-18	1:80 IS-18	1:160 IS-18				
C	1:40 IS-3	1:40 IS-3	1:80 IS-3	1:160 IS-3	1:40 IS-11	1:40 IS-11	1:80 IS-11	1:160 IS-11	1:40 IS-19	1:40 IS-19	1:80 IS-19	1:160 IS-19				
D	1:40 IS-4	1:40 IS-4	1:80 IS-4	1:160 IS-4	1:40 IS-12	1:40 IS-12	1:80 IS-12	1:160 IS-12	1:40 IS-21	1:40 IS-21	1:80 IS-21	1:160 IS-21				
E	1:40 IS-5	1:40 IS-5	1:80 IS-5	1:160 IS-5	1:40 IS-13	1:40 IS-13	1:80 IS-13	1:160 IS-13	1:40 IS-22	1:40 IS-22	1:80 IS-22	1:160 IS-22				
F	1:40 IS-6	1:40 IS-6	1:80 IS-6	1:160 IS-6	1:40 IS-14	1:40 IS-14	1:80 IS-14	1:160 IS-14	1:40 IS-23	1:40 IS-23	1:80 IS-23	1:160 IS-23				
G	1:40 IS-7	1:40 IS-7	1:80 IS-7	1:160 IS-7	1:40 IS-15	1:40 IS-15	1:80 IS-15	1:160 IS-15	1:40 poz ser*	1:40 poz ser	1:80 poz ser	1:160 poz ser				
H	1:40 IS-8	1:40 IS-8	1:80 IS-8	1:160 IS-8	1:40 IS-16	1:40 IS-16	1:80 IS-16	1:160 IS-16	1:40 neg ser*	1:40 neg ser	1:80 neg ser	1:160 neg ser				

Slika 6. Šematski prikaz ploče sa ispitivanim, pozitivnim i negativnim kontrolnim krvnim serumom testa indirektno imunofluorescencije. NI* - neinokulisani redovi; IS* - ispitivani krvni serum; poz ser* - pozitivan kontrolni krvni serum; neg ser* - negativni kontrolni krvni serum

4.2.1.3 ELISA

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa u uzorcima krvnih seruma, mleka i kolostruma korišćen je komercijalni ID Screen® Capripox double antigen Multi-species-ELISA test (Monpelje, Francuska). Ovaj test je zasnovan na otkrivanju kompleksa antigen – antitelo enzimskom reakcijom između enzima vezanog za antigen i supstrata. Specifičnost ovog testa je $\geq 99,7\%$. Namenjen je ispitivanju krvnih seruma i krvne plazme goveda, ovaca i koza. Međutim, u ovoj studiji je dodatno korišćen za ispitivanje uzoraka mleka i kolostruma. Oprema koja je korišćena za izvođenje ELISA testa je navedena u tabeli 3.

Tabela 3. Spisak opreme koja je korišćena za izvođenje ELISA testa

Naziv opreme	Tip	Proizvođač
Univerzalna centrifuga sa hlađenjem	5430R	Eppendorf
Ispirač mikrotitar ploča	-	TECAN hydro FLEX
Mešalica mikrotitar ploča	-	VWR
Spektrofotometar	Classic	TECAN SPECTRA

- Vrednost optičke gustine (OD) očitana je na spektrofotometru koristeći filter talasne dužine od 450 nm.
- Test je smatran validnim ukoliko je OD vrednost pozitivne kontrole veća od 0,350 i ukoliko je vrednost količnika OD vrednosti pozitivne i negativne kontrole veća od 3 ($OD_{PK}/OD_{NK}>3$).
- Za svaki uzorak izračunata je S/P% vrednost po formuli.

$$\frac{S}{P} = \frac{OD_{uzorka} - OD_{nk}}{OD_{pk} - OD_{nk}} \times 100$$

OD uzorka – optička gustina uzorka

OD nk – optička gustina negativne kontrole

OD pk – optička gustina pozitivne kontrole

Uzorci čija je S/P% vrednost <30% se smatraju negativnim

Uzorci čija je S/P% vrednost $\geq 30\%$ se smatraju pozitivnim

Ispitivanje uzoraka mleka je vršeno prema uputstvu proizvođača za krvni serum i plazmu i uz modifikaciju vremena inkubacije uzorka od 24 sata na 4 °C. Uzorci kolostruma su ispitani samo primenom modifikovanog protokola, ali prema graničnoj vrednosti proizvođača za krvne serume i plazmu $S/P\% \geq 30$.

4.2.2 Molekularni testovi

4.2.2.1 Izolacija virusne nukleinske kiseline

Izolacija virusne DNK iz uzoraka briseva nosa, briseva usta, krvi sa EDTA antikoagulansom i maceriranih muva u PBS-u je vršena upotrebom komercijalnog kita NucleoMag vet (Machey-Nagel GmbH, Nemačka), koristeći aparat Multidrop DW (Thermo Scientific, Finska) za punjenje ploča i King Fisher Flex aparata (Thermo Scientific, Finska) za automatsku izolaciju. Oprema koja je korišćena za izolaciju virusne DNK je navedena u tabeli 4.

Tabela 4. Spisak opreme koja je korišćena za izolaciju virusne DNK

Naziv opreme	Tip	Proizvođač
Biohazard kabinet	B-(MaxPro)	Berner Flow Safe
Univerzalna centrifuga sa hlađenjem	5430R	Eppendorf
Centrifuga	5810R	Eppendorf
Homogenizator	Tissue Lyser II	QIAGEN
Uređaj za punjenje ploča	-	Thermo scientific
Uređaj za ekstrakciju	King Fisher Flex	Thermo scientific

Postupak izolacije:

1. Korak: liziranje uzoraka. U 96 bunarsku mikrotitar ploču zapremine 2 ml je naliveno 200 μ l homogenizovanog uzorka, zatim 20 μ l prethodno resuspendovane proteinaze K, 4 μ l „carrier“ RNK i 180 μ l VL1 pufera. Ploča je zatvorena samolepljivom aluminijumskom folijom i izmešana na mikseru. Nakon mešanja inkubirana je 15 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Korak: vezivanje virusne DNK za magnetne čestice. Nakon inkubacije, ploča je centrifugirana par sekundi kako bi se kapljice sa poklopca uklonile. Dodato je 600 μ l VEB pufera, 20 μ l magnetnih čestica i 10 μ l interne kontrole (IC2-DNA). Ploče su postavljene u King Fisher Flex aparat po redosledu obeleženom u ležištu i vršen je mašinski deo izolacije virusne DNK. Uzorci su mašinski mešani u trajanju od 2 minuta nakon čega je sledio postupak ispiranja sa inkubacijom od 2 minuta između ispiranja i 10 minuta pre izolacije DNK.
3. Korak: Ispiranje magnetnih čestica u VEW1 puferu. Nakon prebacivanja magnetnih čestica u VEW1 pufer, magnetne čestice su izmešane sa puferom u trajanju od 1 minuta, a potom su inkubirane 2 minuta u puferu. Nakon inkubiranja magnetne čestice su pokupljene i isprane u puferu VEW2.
4. Korak: Ispiranje magnetnih čestica u VEW2 puferu. Nakon prebacivanja magnetnih čestica u VEW2 pufer, magnetne čestice su izmešane sa puferom u trajanju od 1 minuta, a potom su inkubirane 2 minuta u puferu. Nakon inkubiranja magnetne čestice su pokupljene i isprane u 80% etanolu.

5. Korak: Ispiranje magnetnih čestica u 80% etanolu. Nakon prebacivanja magnetnih čestica u 80% etanol, magnetne čestice su izmešane u etanolu u trajanju od 1 minuta, a potom su inkubirane 2 minuta u 80% etanolu. Nakon inkubiranja magnetne čestice su pokupljene i osušene na vazduhu.
6. Korak: Sušenje magnetnih čestica na vazduhu. Pokupljene magnetne čestice su osušene na vazduhu u trajanju od 10 minuta (ceo proces se odvijao u zatvorenom sistemu).
7. Korak: Otpuštanje virusne DNK i IC2-DNK. Magnetne čestice su prebačene u VEL pufer u kojem su izmešane u trajanju od 5 minuta, za koje vreme je došlo do otpuštanja DNK. Magnetne čestice su potom uklonjene iz pufera. Po odstranjivanju magnetnih čestica iz VEL pufera, ploča sa izolovanom DNK je zalepljena samolepljivom aluminijumskom folijom i skladištena na -20 °C do upotrebe u Real-Time PCR testu.

4.2.2.2 *Real-Time PCR*

Svi uzorci izolovane DNK su ispitani na prisustvo genoma virusa nodularnog dermatitisa po već opisanoj metodi od strane Bowdena i sar. (2008) sa modifikacijom prajmera prema Dietze i sar. (2018) za detekciju P32 gena (tabela 5). Za internu kontrolu izolacije i amplifikacije je korišćen protokol opisan od strane Hoffmanna i sar. (2006) (tabela 5). Svi prajmeri i probe su sintetisani u kompaniji Metabion (Mantiensried, Nemačka). Oprema koja je korišćena za izvođenje Real-Time PCR metode je navedena u tabeli 6.

Tabela 5. Spisak korišćenih prajmera i proba

	Oznaka	Sekvence prajmera i proba (5' – 3')
capripoks	Capri-P32-F	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
	Capri-P32- R	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA
	Capri-P32-FAM-Taq	FAM-ATG GAT GGC TCA TAG ATT TCC TGA T-BHQ1
EGFP-Mix 1 (limit 5) HEX	EGFP1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC
	EGFP2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
	EGFP-Proba 1	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1

Tabela 6. Spisak opreme koja je korišćena za Real-Time PCR

Naziv opreme	Tip	Proizvođač
PCR kabinet	-	PEQlab Biotechnologie
PCR kabinet	-	UVC/T-M-AR
Robot za punjenje 384 bunarske ploče	Liquidator 96 model 20 μ l	Mettler Toledo
Centrifuga	5804	Eppendorf
Real-Time mašina	CFX384	BIO-RAD CFX384 Touch™

Real-Time PCR je izveden upotrebom komercijalnog kita PerfeCTa qPCR Tough Mix (Quanta BioSciences) u zapremini od 25 μ l. Reakciona smeša je pripremljena na ledu prema tabeli 7.

Tabela 7. Reakciona smeša za izvođenje Real-Time PCR

Reagensi	Zapremina (μ l)/uzorku
Voda	3,5
2X PerfeCTa qPCR Toughmix	12,5
Capri-p32-Mix-Taq-FAM 15 pmol/ μ l	2,0
EGFP-Mix-1(5)-HEX 5 pmol/ μ l	2,0
Ukupno	20,0

Reakcija je izvođena u 384 bunarskoj PCR ploči. Za razlivanje reakcione smeše i ispitivanih uzoraka korišćen je robot Liquidator 96 (Mettler Toledo, India). Reakcionoj smeši je dodato po 5 μ l izolovane DNK. Uzorci krvi sa EDTA, brisevi nosa i usta, kao i hematofagni insekti su pripremljeni kao zbirni poreklom od istih životinja i farmi. Primer: jedan zbirni uzorak krvi sa EDTA predstavljao je dva ili tri uzorka krvi sa EDTA prikupljenih od jedne životinje, ali različitog vremenskog perioda (pre revakcinacije, mesec dana i pet meseci nakon revakcinacije). Temperaturni profil reakcije dat je u tabeli 8.

Tabela 8. Temperaturni profil Real-Time PCR

Aktiviranje taq polimeraze	3 minuta	95 °C	45 ciklusa
Denaturacija DNK	15 sekundi	95 °C	
Hibridizacija prajmera	15 sekundi	60 °C	
Izduživanje lanca DNK	15 sekundi	72 °C	

Za izvođenje Real-Time PCR reakcije korišćen je uređaj Bio Rad (Bio Rad CFX384 Touch™, Francuska). Uzorci čije su Ct (Cycle treshold) vrednosti ispod 40 se smatraju pozitivnim, između 40 i 45 nespecifičnim ili sumnjivim, a iznad 45 negativnim.

4.2.3 Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka krvnih seruma od goveda korišćen je program GraphPad Prisma verzija 7 (San Diego, CA, USA) i Fišerov egzaktni test.

Statistička analiza rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka krava iz Srbije ELISA testom je rađena u RStudio Team programu (2015) (RStudio: Integrated Development for R. RStudios, Inc., Boston, MA) koristeći paket „OptimalCutpoints“ za ROC analizu (Receiver operating characteristic). Za utvrđivanje optimalne granične vrednosti („*cut off*“) postavljen je uslov maksimalne specifičnosti i izračunavanje Youden indeksa kao mere efikasnosti testa. Za referentne vrednosti su uzeti rezultati dobijeni ispitivanjem seruma istih krava ELISA testom. McNemar test je korišćen za utvrđivanje statističke značajnosti (p) i vrednosti Hi kvadrata (χ^2) za rezultate dobijene ispitivanjem uzoraka mleka iz Srbije ELISA testom.

5 Rezultati

5.1 Rezultati ispitivanja aktivnog imunskog odgovora

5.1.1 Materijal i zapažanje na gazdinstvima

Od svih životinja koje su bile uključene u eksperiment, dve junice starosti 6 i 8 meseci nisu bile vakcinisane u 2016. godini. Revakcinacija goveda u 2017. godini sprovedena je u razmaku od 47 do 50 nedelja od vakcinacije u 2016. godini. Na svim gazdinstvima uključenim u eksperiment, goveda se gaje u zatvorenom prostoru bez ispaše, izuzev jednog gazdinstva koje goveda gaji u zatvorenom prostoru i na ispaši. Razdaljina između farmi iznosila je približno 200 do 500 metara bez mogućnosti direktnog kontakta između životinja. Kliničkim pregledom životinja na dan uzorkovanja nije ustanovljeno prisustvo vidljivih ili palpabilnih kožnih nodula, pojačane lakrimacije, iscetka iz nosa, pojačane salivacije i kliničkih oblika mastitisa krava u laktaciji. Takođe, prema anamnezi uzetoj od vlasnika, nije bilo prisutnih kliničkih znakova bolesti, kao ni lečenja životinja u periodu od mesec dana pre uzimanja uzoraka. Za revakcinaciju goveda korišćena je homologna vakcina BOVIVAX LSD-N (M.C.I. Sante Animale, Maroko). Nakon revakcinacije, nije bilo prijavljenih slučajeva neželjenih reakcija.

Uzorkovanje krvnog seruma, pre revakcinacije i mesec dana nakon revakcinacije je sprovedeno od svih 79 životinja dok je uzorkovanje krvnog seruma pet meseci nakon revakcinacije sprovedeno od 74 životinje, jer je 5 životinja u međuvremenu prodato.

5.1.2 Virus neutralizacioni test (VNT)

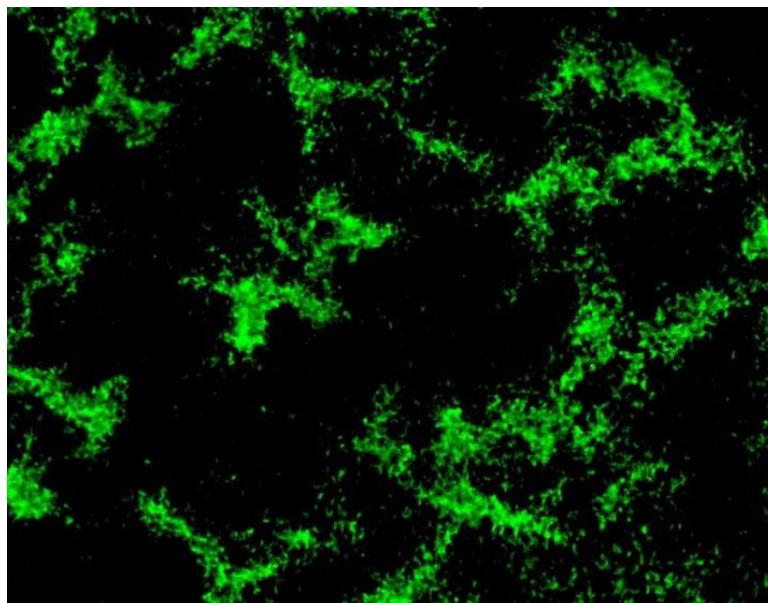
Kod uzorkovanja pre revakcinacije, 27 životinja (35,06%) je reagovalo pozitivno (titar antitela 1:13 - 1:512). Nakon revakcinacije, broj pozitivnih životinja je porastao na 60 (75,95%), kao i titar antitela koji se kretao od 1:16 do 1:640. Ispitivanjem uzoraka krvnih seruma prikupljenih pet meseci nakon revakcinacije, broj seropozitivnih životinja je opao na 42 (56,76%), ali je titar antitela ostao stabilan (1:13 do 1:800) (tabela 9). Upoređujući rezultate dobijene ispitivanjem uzoraka krvnih seruma pre i posle revakcinacije, utvrđeno je da je 5 životinja imalo viši titar antitela pre revakcinacije, nego posle (320-256; 512-320; 256-200; 128-64 i 100-80). Takođe, poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka krvnih seruma pet meseci nakon revakcinacije sa rezultatima dobijenim ispitivanjem uzoraka krvnih seruma mesec dana nakon revakcinacije, 7 životinja je imalo viši titar antitela pet meseci nakon revakcinacije (320-640; 256-512; 100-128; 50-800; 256-320; 80-128 i 25-40).

Tabela 9. Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvnih seruma VN testom u odnosu na vreme uzorkovanja

Titar antitela	Pre revakcinacije (broj životinja)	Mesec dana nakon revakcinacije (broj životinja)	Pet meseci nakon revakcinacije (broj životinja)
≥ 300	3	6	6
200-300	3	10	2
100-200	8	14	9
50-100	5	13	7
10-50	8	17	18
≤ 10	52	19	32

5.1.3 Test indirektne imunofluorescencije (IFAT)

Test je smatran validnim ukoliko se kod pozitivnog kontrolnog seruma u svim razređenjima uočavala jasna zelena fluorescencija odnosno ukoliko je fluorescencija izostala kod neinokulisanih ćelija, i u svim razređenjima negativnog kontrolnog seruma (slika 7). Specifična antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa testom indirektne imunofluorescencije su dokazana kod 26 (33,77%) životinja pre revakcinacije; titar antitela se kretao od 1:40 do preko 1:160. Broj seropozitivnih životinja kao i titar antitela značajno su porasli nakon revakcinacije. Broj pozitivnih životinja je iznosio 68 (86,08%), a titar antitela je bio preko 1:160 kod 37 životinja. Međutim, pet meseci nakon revakcinacije, broj seropozitivnih životinja kao i titar antitela su opali na 43 (58,11%) seropozitivne životinje i titar antitela od preko 1:160 kod 19 životinja (tabela 10).



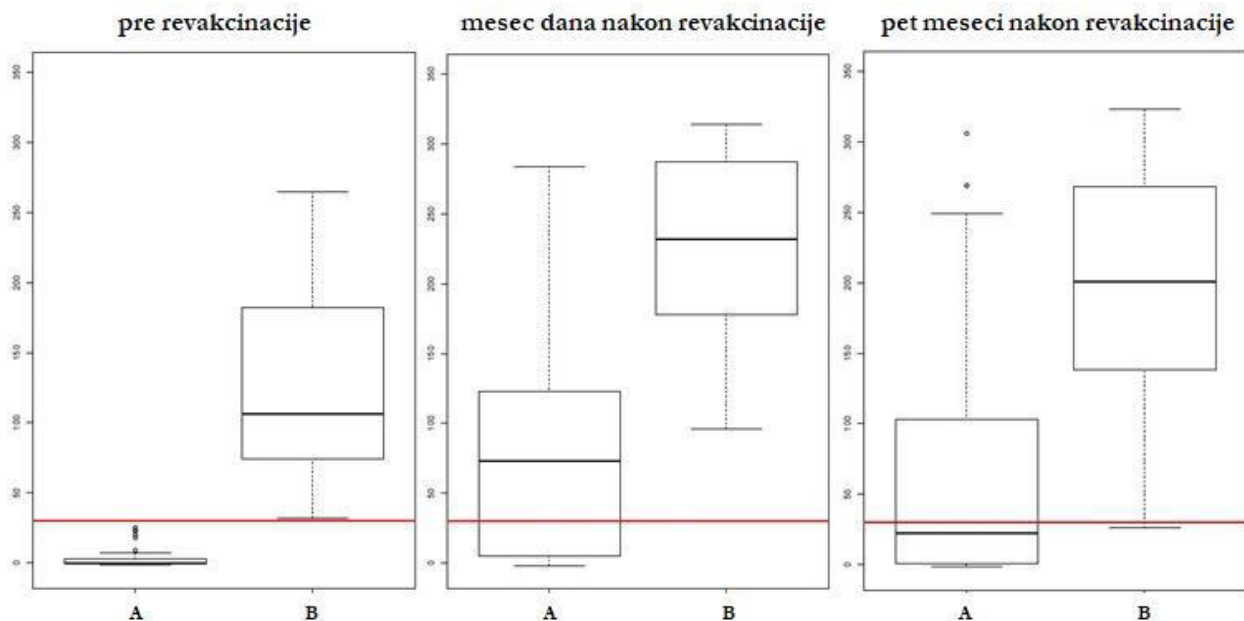
Slika 7. Izgled pozitivne reakcije imunofluorescencije na fluorescentnom mikroskopu

Tabela 10. Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvnih seruma testom indirektno imunofluorescencije u odnosu na vreme uzorkovanja

Titular antitela	Pre revakcinacije (broj životinja)	Mesec dana nakon revakcinacije (broj životinja)	Pet meseci nakon revakcinacije (broj životinja)
≥ 160	10	37	19
80	3	22	13
40	13	9	11
≤ 40	53	11	31

5.1.4 ELISA

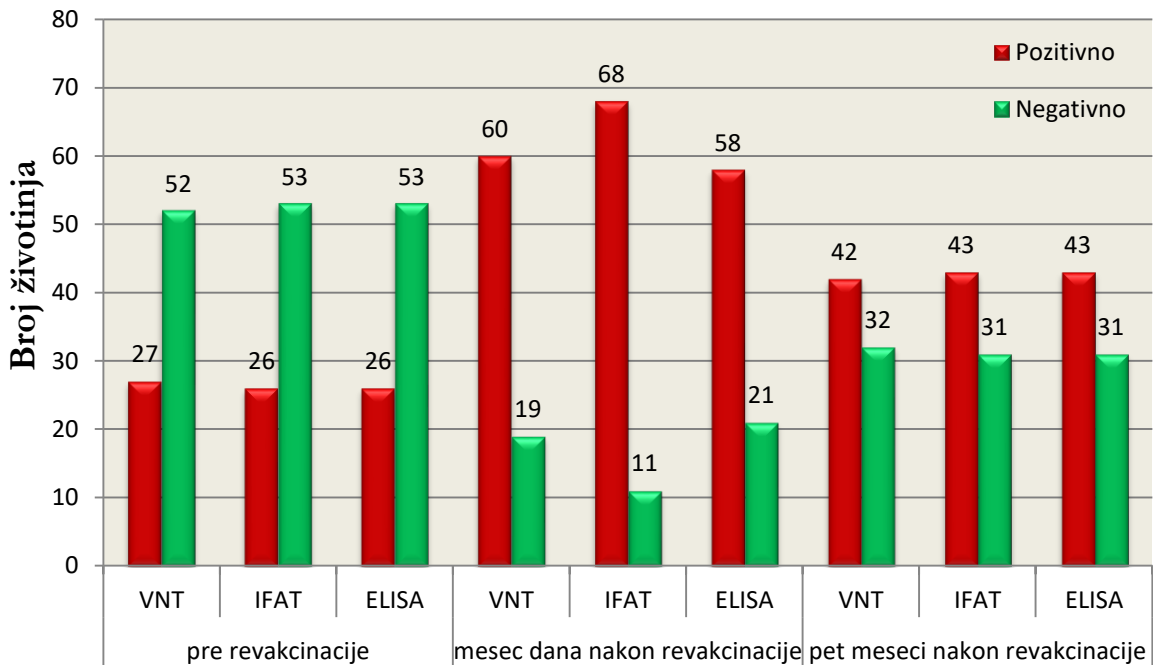
Prisustvo specifičnih antitela je utvrđeno kod 26 (33,77%) životinja pre revakcinacije sa S/P% vrednošću preko 200 kod 6 životinja. Porast broja seropozitivnih životinja na 58 (73,42%) kao i porast S/P% vrednosti na preko 300 kod 3 životinje uočen je mesec dana nakon revakcinacije. Broj seropozitivnih životinja je opao na 43 (58,11%) seropozitivne životinje 5 meseci nakon revakcinacije. Uprkos istovremenom trendu opadanja S/P% vrednosti, 7 životinja je imalo višu S/P% vrednost pet meseci nakon revakcinacije u poređenju sa rezultatima dobijenim ispitivanjem krvnih seruma mesec dana nakon revakcinacije (234-268; 116-306; 165-233; 178-318; 258-270; 306-323 i 20-117) (slika 8).



Slika 8. Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvnih seruma ELISA testom u odnosu na vreme uzorkovanja. A – životinje koje su reagovale negativno nakon prvog uzorkovanja; B – životinje koje su reagovale pozitivno nakon prvog uzorkovanja; crvena linija – granična vrednost $S/P\% \geq 30$

5.1.5 Uporedna analiza rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka krvnih seruma

Prema rezultatima dobijenim ispitivanjem krvnih seruma upotrebom sva tri serološka testa, detekcija specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa bila je moguća u uzorcima prikupljenim u sva tri vremenska perioda (grafikon 1). Pozitivan efekat revakcinacije uočen je mesec dana nakon revakcinacije povećanjem broja seropozitivnih životinja u odnosu na rezultate dobijene pre revakcinacije. Kod jednog broja životinja nije došlo do serokonverzije nakon revakcinacije (virus neuralizacionim testom 19; testom indirektno imunofluorescencije 10 i ELISA testom 21) (tabela 11).



Grafikon 1. Zbirni prikaz broja detektovanih seropozitivnih i seronegativnih životinja korišćenjem tri testa prema vremenu uzorkovanja

Tabela 11. Prikaz broja detektovanih seropozitivnih i seronegativnih goveda u odnosu na vreme uzorkovanja

Test	Pre/postavka	pre/mesec dana nakon revakcinacije	pre/pet meseci nakon revakcinacije	jedan/pet meseci nakon revakcinacije
VNT	pozitivno/ostalo pozitivno	27	23	42
	pozitivno/postalo negativno	0	2	15
	negativno/postalo pozitivno	33	19	0
	negativno/ostalo negativno	19	30	17
IFAT	pozitivno/ostalo pozitivno	25	20	42
	pozitivno/postalo negativno	1	4	22
	negativno/postalo pozitivno	43	23	1
	negativno/ostalo negativno	10	27	9
ELISA	pozitivno/ostalo pozitivno	26	22	42
	pozitivno/postalo negativno	0	1	13
	negativno/postalo pozitivno	32	21	1
	negativno/ostalo negativno	21	30	18

5.1.6 Statistička analiza

Za izračunavanje osjetljivosti i specifičnosti testa indirektno imunofluorescencije i ELISA testa, korišćeni su rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvnih seruma VN testom. Osetljivost ELISA testa (tabela 12) iznosila je 91%, a specifičnost 87%, dok je osjetljivost testa indirektno imunofluorescencije (tabela 13) iznosila 85%, a specifičnost 86%. Uzimajući rezultate testa indirektno imunofluorescencije kao referentne, osjetljivost ELISA testa iznosila je 88%, a specifičnost 76% (tabela 14)

Tabela 12. Dijagnostičke performanse ELISA testa

	ELISA +	ELISA -
VNT+	115	14
VNT -	12	91
Ukupno	127	105
osjetljivost/specifičnost	0,9055	0,8667

Tabela 13. Dijagnostičke performanse testa indirektno imunofluorescencije

	IFAT +	IFAT -
VNT +	116	13
VNT -	21	82
Ukupno	137	95
osjetljivost/specifičnost	0,8467	0,8632

Tabela 14. Dijagnostičke performanse ELISA testa u odnosu na test indirektno imunofluorescencije

	ELISA +	ELISA -
IFAT +	112	25
IFAT -	15	80
Ukupno	127	105
osjetljivost/specifičnost	0,8818	0,7619

Statistički značajna razlika uočena je između rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka krvnih seruma mesec dana i pet meseci nakon revakcinacije u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem uzoraka krvnih seruma pre revakcinacije za sva tri testa (tabela 15).

Tabela 15. Statistička značajnost između korišćenih testova i vremena uzorkovanja

Vreme uzorkovanja	Test	P vrednost	Rezultati
Pre revakcinacije	VNT/IFAT	1	p>0.05
	VNT/ELISA	1	p>0.05
	IFAT/ELISA	1	p>0.05
Mesec dana nakon revakcinacije	VNT/IFAT	0.1549	p>0.05
	VNT/ELISA	0.855	p>0.05
	IFAT/ELISA	0.0738	p>0.05
Pet meseci nakon revakcinacije	VNT/IFAT	1	p>0.05
	VNT/ELISA	1	p>0.05
	IFAT/ELISA	1	p>0.05
pre revakcinacije / mesec dana nakon revakcinacije	VNT/VNT	<0.0001	p<0.0001
pre revakcinacije / pet meseci nakon revakcinacije	VNT/VNT	0.0059	p<0.01
jedan / pet meseci nakon revakcinacije	VNT/VNT	0.0161	p<0.05
pre revakcinacije / mesec dana nakon revakcinacije	IFAT/IFAT	<0.0001	p<0.0001
pre revakcinacije / pet meseci nakon revakcinacije	IFAT/IFAT	0.0021	p<0.01
jedan / pet meseci nakon revakcinacije	IFAT/IFAT	0.0001	p<0.001
pre revakcinacije / mesec dana nakon revakcinacije	ELISA/ELISA	<0.0001	p<0.0001
pre revakcinacije / pet meseci nakon revakcinacije	ELISA/ELISA	0.0021	p<0.01
jedan / pet meseci nakon revakcinacije	ELISA/ELISA	0.0601	p>0.05

5.2 Rezultati ispitivanja karakteristika ELISA testa za ispitivanje seruma

Svi uzorci krvnih seruma svinja seropozitivnih na suipoksvirus su reagovali negativno na ELISA testu (S/P% vrednosti 0 i 1) za serološku dijagnostiku nodularnog dermatitisa.

5.3 Rezultati ispitivanja pasivnog imunskog odgovora

5.3.1 Materijal i zapažanje na farmama

Uzorci za ispitivanje kolostralno prenetih antitela prikupljeni su od 17 krava vakcinisanih u 2016. godini i revakcinisanih u 2017. godini. Kliničkim pregledom na dan teljenja i uzimanjem

anamneze od vlasnika nije ustanovljeno prisustvo vidljivih ili palpabilnih kožnih nodula i drugih simptoma bolesti. Takođe, životinje nisu lečene u mesec dana pre teljenja. Pri drugoj poseti farmi 14 dana nakon teljenja, sva telad su bila zdrava. Krave su bile u dobroj kondiciji i bez dijagnostikovanih mastitisa ili nekih drugih oboljenja. Uzorci su prikupljeni od svih 17 krava i 20 novorođenih teladi jer su se tri krave obliznile.

5.3.2 Rezultati ispitivanja kolostruma i krvnih seruma majki i teladi

Utvrđivanje prisustva kolostralnih antitela u krvnom serumu teladi bilo je moguće 14. dana starosti kod 9 teladi virus neutralizacionim i ELISA testom, odnosno kod 15 teladi testom indirektno imunofluorescencije. Kolostralna antitela u krvnom serumu teladi stare 14 dana nisu dokazana kod jednog teleta (#11) virus neutralizacionim testom, kod tri teleta (#14ž1; #14ž2 i #15) testom indirektno imunofluorescencije iako su rezultati ispitivanih krvnih seruma majki bili pozitivni. Uprkos činjenici da su specifična antitela dokazana u kolostrumu, kod jednog teleta (#11) specifična antitela nisu ustanovljena, u krvnom serumu upotrebom virus neutralizacionog i ELISA testa 14. dana starosti. Sa druge strane, jedno tele (#17) je reagovalo pozitivno testom indirektno imunofluorescencije dok je krvni serum njegove majke reagovao negativno na svim testovima. Detaljni rezultati su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Rezultati dobijeni ispitivanjem kolostruma i krvnih seruma majki i teladi. n.t.* – nije testirano

ID	Majke				ID	Telad				
	kolostrum		serum			0 dana starosti		14 dana starosti		
	ELISA	ELISA	VNT	IFAT		ELISA	IFAT	ELISA	VNT	IFAT
1	0	-2	<1:10	1:80	1	-2	<1:40	-1	<1:10	1:80
2	-2	-1	<1:10	1:40	2	-2	<1:40	0	<1:10	1:160
3	0	-2	<1:10	1:80	3	-2	<1:40	0	<1:10	1:40
4	-2	-2	<1:10	1:160	4	-2	<1:40	-1	<1:10	1:160
5	190	49	1:32	1:160	5	-1	<1:40	101	1:32	1:80
6	200	383	1:256	1:160	6	-1	<1:40	305	1:200	1:160
7	323	140	1:100	1:160	7	-2	<1:40	227	1:64	1:80
8	5	-2	<1:10	1:160	8	-2	<1:40	-1	<1:10	1:40
9	-1	-3	<1:10	<1:40	9	-2	<1:40	-2	<1:10	<1:40
10	479	241	1:128	1:160	10	-2	<1:40	315	1:200	1:160
11	85	-3	1:16	1:80	11	-1	<1:40	-3	<1:10	1:40
12	436	281	1:128	1:160	12	-1	<1:40	269	1:80	1:160
13	38	68	1:20	1:80	13ž	-2	<1:40	71	1:40	1:80
					13m	-1	<1:40	65	1:20	1:40
14	16	1	<1:10	1:160	14ž1	-2	<1:40	-2	n.t.*	<1:40
					14ž2	-2	<1:40	-1	<1:10	<1:40
15	59	3	1:25	1:160	15	-2	<1:40	1	n.t.	<1:40
16	439	190	1:128	1:80	16ž	-2	<1:40	192	1:64	1:80
					16m	-3	<1:40	254	1:80	1:80
17	0	-3	<1:10	<1:40	17	-3	<1:40	-3	<1:10	1:80

5.4 Rezultati ispitivanja karakteristika ELISA testa za ispitivanje mleka

5.4.1 Rezultati dobijeni ispitivanjem pojedinačnih i zbirnih uzoraka mleka poreklom iz Republike Srbije ELISA testom

ELISA testom ispitani su uzorci mleka korišćenjem protokola po uputstvu proizvođača i modifikovanim protokolom.

5.4.1.1 ROC analiza rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka poreklom iz Republike Srbije ELISA testom

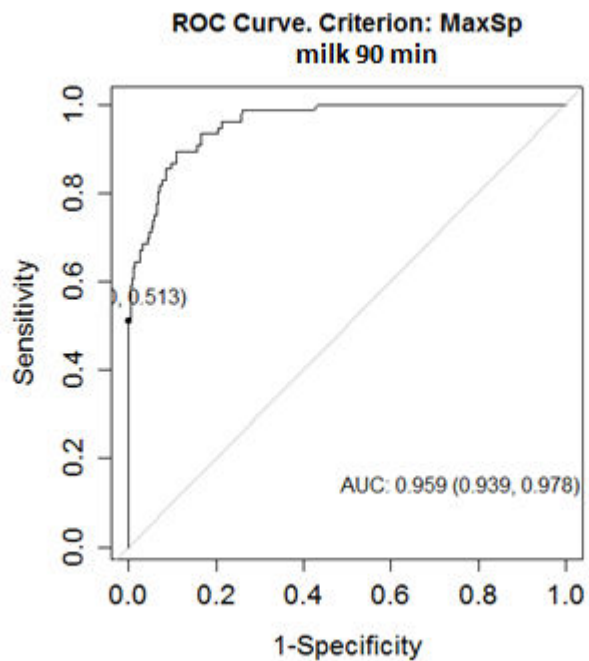
Za referentne vrednosti u ROC analizi, uzeti su rezultati dobijeni ispitivanjem krvnih seruma ELISA testom krava od kojih je uzorkovano mleko.

5.4.1.1.1 Maksimalna specifičnost

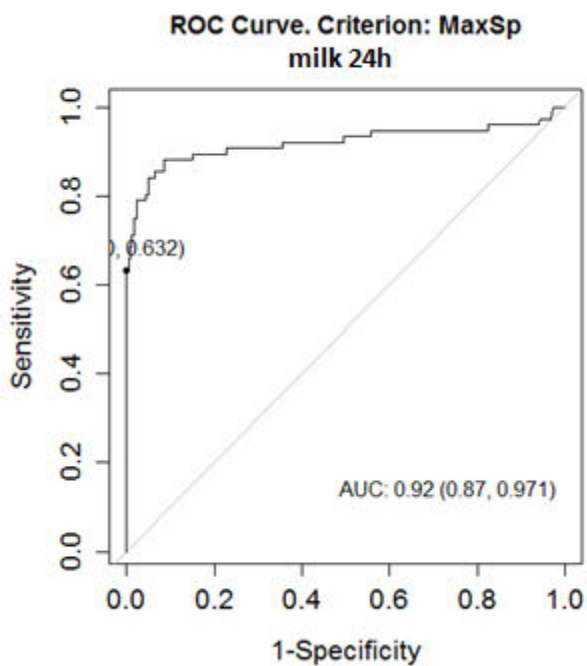
Najprikladnija granična vrednost za ispitivanje uzoraka mleka komercijalnim ELISA testom je $S/P\% \geq 10$ (tabela 17), ukoliko se u ROC analizi kao uslov postavi maksimalna specifičnost (100%). Korišćenjem ove granične vrednosti ostale karakteristike testa (osetljivost i prediktivne vrednosti) su bolje kada se uzorci mleka ispituju modifikacijom vremena inkubacije uzorka. Rezultati ROC krive prikazani su grafički na slikama 9 i 10.

Tabela 17. Tabelarni prikaz ROC analize za zadati uslov maksimalne specifičnosti

	Mleko 90 minuta inkubacija	Mleko 24 sata inkubacija
AUC (area under curve)	0,959 (0,939; 0,978)	0,92 (0,87; 0,971)
Granična vrednost	9,4250707	9,7845079
Se	0,5131579	0,6315789
Sp	1,0000000	1,0000000
ppv	1,0000000	1,0000000
pnv	0,9207709	0,9387309



Slika 9. Grafički prikaz ROC krive za zadati uslov maksimalne specifičnosti za rezultate dobijene protokolom proizvođača



Slika 10. Grafički prikaz ROC krive za zadati uslov maksimalne specifičnosti za rezultate dobijene modifikacijom vremena inkubacije

5.4.1.1.2 Youden metod

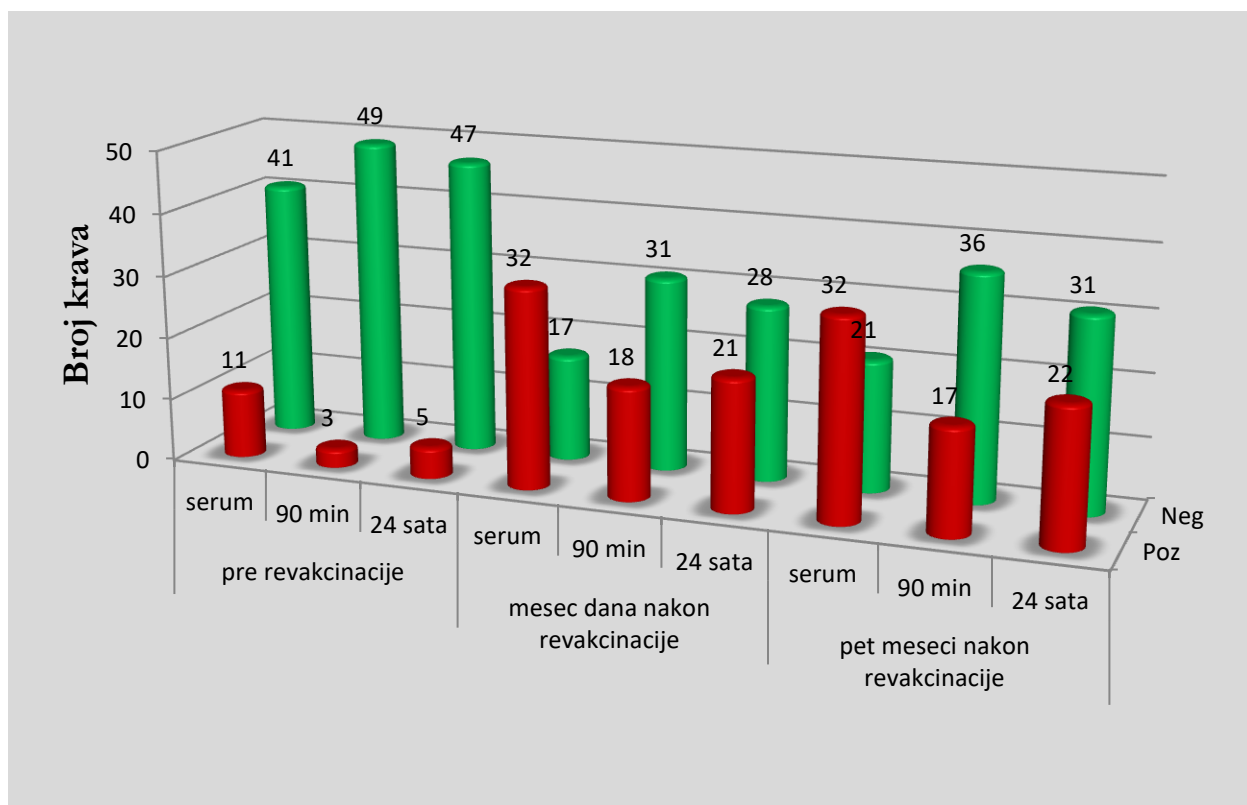
Za izračunavanje optimalne granične vrednosti kojom se obezbeđuje maksimalna efikasnost testa, određivan je Youden index. Bolja vrednost Youden indeksa dobijena je ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka modifikacijom vremena inkubacije uzorka i iznosila je 0,7953318, u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem uzoraka mleka prema protokolu proizvođača koji su imali vrednost Youden indeksa 0,7854345. Ostale karakteristike ELISA testa (specifičnost, osetljivost, granične i prediktivne vrednosti) prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18. Tabelaran prikaz ROC analize koristeći Youden metod

	Mleko 90 minuta inkubacija	Mleko 24 sata inkubacija
AUC (area under curve)	0,959 (0,939; 0,978)	0,92 (0,87; 0,971)
Granična vrednost	1,3081955	3,0859662
Se	0,8947368	0,8815789
Sp	0,8906977	0,9137529
ppv	0,5913043	0,6442308
pnv	0,9795396	0,9775561
Youden index	0,7854345	0,7953319

5.4.1.2 Rezultati dobijeni ispitivanjem pojedinačnih i zbirnih uzoraka mleka poreklom iz Republike Srbije ELISA testom prema graničnoj vrednosti S/P% ≥ 10

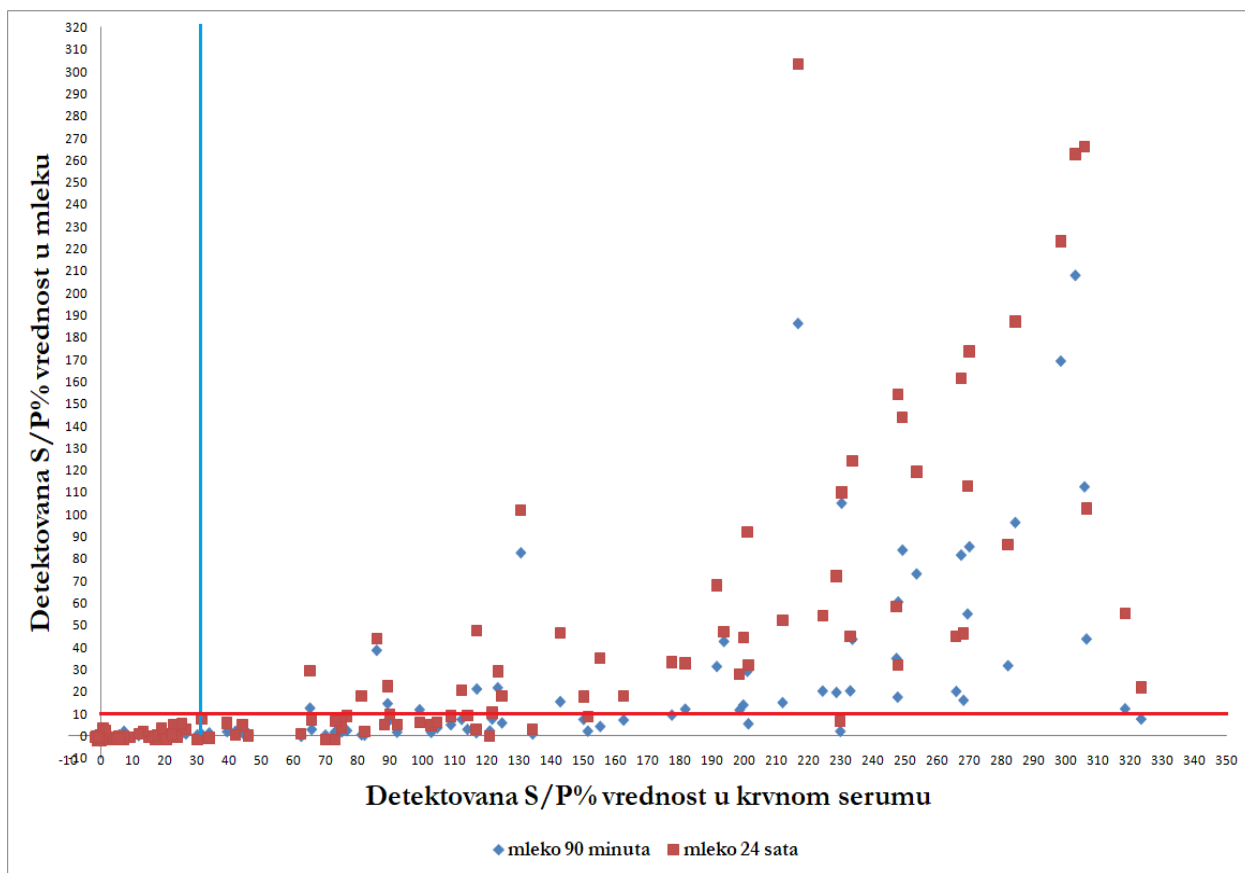
Broj pozitivno detektovanih pojedinačnih uzoraka mleka prema protokolu proizvođača i graničnoj vrednosti S/P% ≥ 10 pre revakcinacije iznosio je 3, mesec dana nakon revakcinacije 18, a pet meseci nakon revakcinacije 17. Modifikacijom vremena inkubacije i prema graničnoj vrednosti S/P% ≥ 10 , broj pozitivnih pojedinačnih uzoraka mleka pre revakcinacije je iznosio 5, mesec dana nakon revakcinacije 21, a pet meseci nakon revakcinacije 22 (grafikon 2). Protokolom proizvođača najveći procenat pozitivnih pojedinačnih uzoraka mleka detektovan je kod krava koje su bile u laktaciji duže od 6 meseci. Međutim, modifikacijom protokola najveći procenat pozitivnih pojedinačnih uzoraka mleka detektovan je kod krava koje su bile u laktaciji do 3 meseca (tabela 19). Poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka sa rezultatima ispitivanja krvnih seruma ELISA testom, najusaglašenije rezultate imale su krave koje su imale visoke S/P% vrednosti i dnevno proizvodile do 15 litara mleka (slika 11, tabela 20 i tabela 21). Utvrđeno je da je ELISA test namenjen ispitivanju zbirnih uzoraka mleka niže osetljivosti u odnosu na ispitivanje pojedinačnih uzoraka (tabela 22).



Grafikon 2. Poređenje rezultata dobijenih ispitivanjem krvnih seruma (granična vrednost S/P% ≥ 30) i pojedinačnih uzoraka mleka sa dva vremena inkubacije i graničnom vrednošću S/P% ≥ 10 u odnosu na period uzorkovanja

Tabela 19. Poređenje rezultata dobijenih ispitivanjem krvnih seruma (granična vrednost S/P% ≥ 30) i pojedinačnih uzoraka mleka sa dva vremena inkubacije (graničnom vrednošću S/P% ≥ 10) u odnosu na period laktacije iz sva tri vremenska perioda uzorkovanja

Period laktacije	Serum		Mleko			
			90 minuta		24 sata	
	Pozitivno	Negativno	Pozitivno	Negativno	Pozitivno	Negativno
< 3	22 (52,38%)	20 (47,76%)	10 (23,81%)	32 (76,19%)	15 (35,71%)	27 (64,29%)
3-6	14 (45,16%)	17 (54,84%)	7 (22,58%)	24 (77,42%)	9 (29,03%)	22 (70,97%)
> 6	39 (48,15%)	42 (51,85%)	21 (25,93%)	60 (74,07%)	24 (29,63%)	57 (70,37%)



Slika 11. Prikaz odnosa S/P% vrednosti ispitanih pojedinačnih uzoraka mleka protokolom proizvođača i modifikovanim protokolom u odnosu na detektovane S/P% vrednosti ispitivanih krvnih seruma. Plava linija – granična vrednost za uzorke krvnih seruma S/P% ≥ 30 ; crvena linija – granična vrednost za pojedinačne uzorke mleka S/P% ≥ 10

Tabela 20. Rezultati dobijeni ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka (granična vrednost S/P% ≥ 10) u odnosu na detektovane S/P% vrednosti pozitivnih uzoraka krvnih seruma

Uzorci krvnih seruma pozitivno detektovani ELISA testom		Rezultati ispitivanih pojedinačnih uzoraka mleka			
		90 minuta inkubacija		24 sata inkubacija	
S/P% vrednost seruma	Broj uzoraka seruma	Pozitivno	Negativno	Pozitivno	Negativno
≥ 201	28	25 (89,29%)	3 (10,71%)	27 (96,43%)	1 (3,57%)
101-200	24	9 (37,50%)	15 (62,50%)	16 (66,67%)	8 (33,33%)
30-100	23	4 (17,39%)	19 (82,61%)	5 (21,74%)	18 (78,26%)

Tabela 21. Poređenje rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka (granična vrednost S/P% ≥ 10) u odnosu na pozitivno detektovane uzorke krvnog seruma ELISA testom u odnosu na dnevnu proizvodnju mleka iz sva tri vremenska perioda uzorkovanja

Dnevna proizvodnja mleka u litrima	Serum	Pojedinačno mleko			
		Inkubacija 90 minuta		Inkubacija 24 sata	
		Pozitivno	Negativno	Pozitivno	Negativno
≤ 15	39	24 (64,54%)	15 (35,56%)	28 (71,79%)	11 (28,21%)
16-20	15	8 (53,33%)	7 (46,47%)	10 (66,67%)	5 (33,33%)
≥ 20	21	6 (28,51%)	15 (71,49%)	10 (47,62%)	11 (52,38%)

Tabela 22. Rezultati dobijeni ispitivanjem zbirnih uzoraka mleka (granična vrednost S/P% ≥ 10) u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka (granična vrednost S/P% ≥ 10). I* - pre revakcinacije; II* - mesec dana nakon revakcinacije; III* - pet meseci nakon revakcinacije

Broj krava uključenih u zbirni uzorak mleka iz laktofriza	ID gazdinstava	Vremenski period uzorkovanja (I*, II* i III*)	Rezultati ispitivanja pojedinačnih uzoraka mleka		Rezultati ispitivanja zbirnih uzoraka mleka	
			90 minuta inkubacija +/-	24 sata inkubacija +/-	90 minuta inkubacija	24 sata inkubacija
2	1	II	2/0	2/0	pozitivno	pozitivno
	2	III	1/1	1/1	pozitivno	pozitivno
	5	I	0/2	1/1	negativno	negativno
		II	1/1	1/1	negativno	pozitivno
	6	I	1/1	1/1	pozitivno	pozitivno
		III	2/0	2/0	pozitivno	pozitivno
	7	III	2/0	2/0	pozitivno	pozitivno
	8	III	1/1	2/0	negativno	pozitivno
	9	III	1/1	1/1	pozitivno	pozitivno
	10	III	1/1	1/1	pozitivno	pozitivno
	11	I	0/2	0/2	negativno	negativno
		II	0/2	0/2	negativno	negativno
	III	0/2	1/1	negativno	negativno	
3	1	I	1/2	1/2	pozitivno	pozitivno
		III	3/0	3/0	pozitivno	pozitivno
	4	III	1/2	2/1	negativno	pozitivno
	9	I	1/2	1/2	negativno	negativno

		II	1/2	1/2	pozitivno	pozitivno
	12	I	0/3	0/3	negativno	negativno
		II	3/0	3/0	pozitivno	pozitivno
	3	I	0/4	0/4	negativno	negativno
		II	1/3	1/3	negativno	negativno
		III	0/4	0/4	negativno	negativno
4	4	I	0/4	0/4	negativno	negativno
		II	3/1	3/1	pozitivno	pozitivno
	11	III	0/4	0/4	negativno	negativno
	16	III	1/3	1/3	negativno	pozitivno
5	13	III	2/3	2/3	negativno	pozitivno
	15	III	0/5	1/4	negativno	negativno
	15	I	0/6	0/6	negativno	negativno
		II	0/6	2/4	negativno	negativno
6	16	I	0/6	0/6	negativno	negativno
		II	1/5	2/4	negativno	pozitivno
7	13	I	0/7	0/7	negativno	negativno
		II	3/4	4/3	pozitivno	pozitivno
9	14	III	1/8	2/7	negativno	negativno
10	14	I	0/10	1/9	negativno	negativno
		II	3/7	2/8	negativno	negativno

5.4.1.3 McNemar test uzoraka mleka poreklom iz Republike Srbije

Rezultati dobijeni McNemar testom prikazani su u tabeli 23. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka u skladu sa protokolom proizvođača i rezultata dobijenih modifikovanim protokolom ($p < 0,05$).

Tabela 23. Rezultati McNemar testa

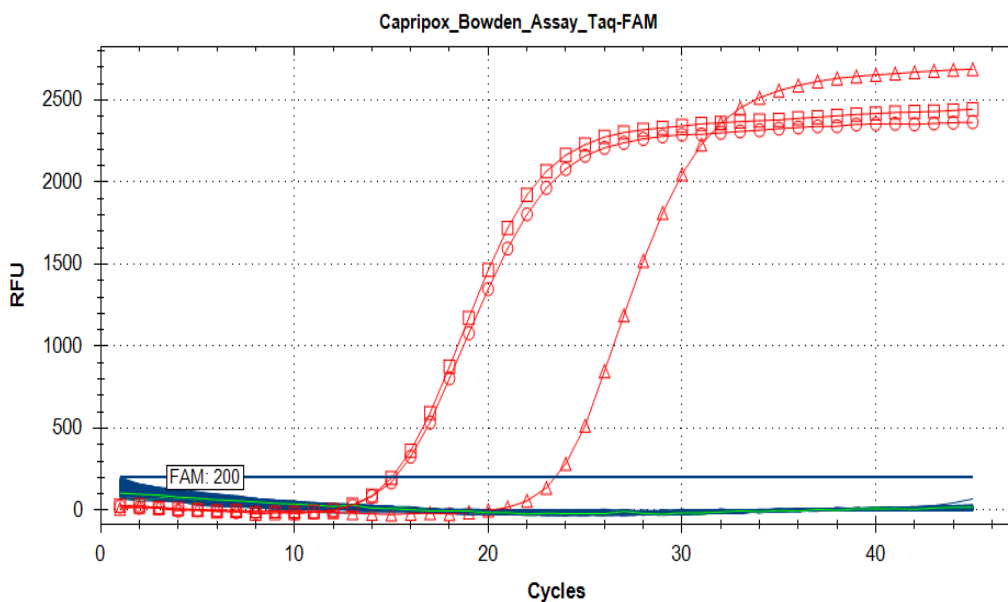
	Broj uzoraka	χ^2 - kvadrat	p vrednost
Vrednosti	154	5,8	0,016

5.4.2 Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka mleka sa teritorije Savezne Republike Nemačke ELISA testom

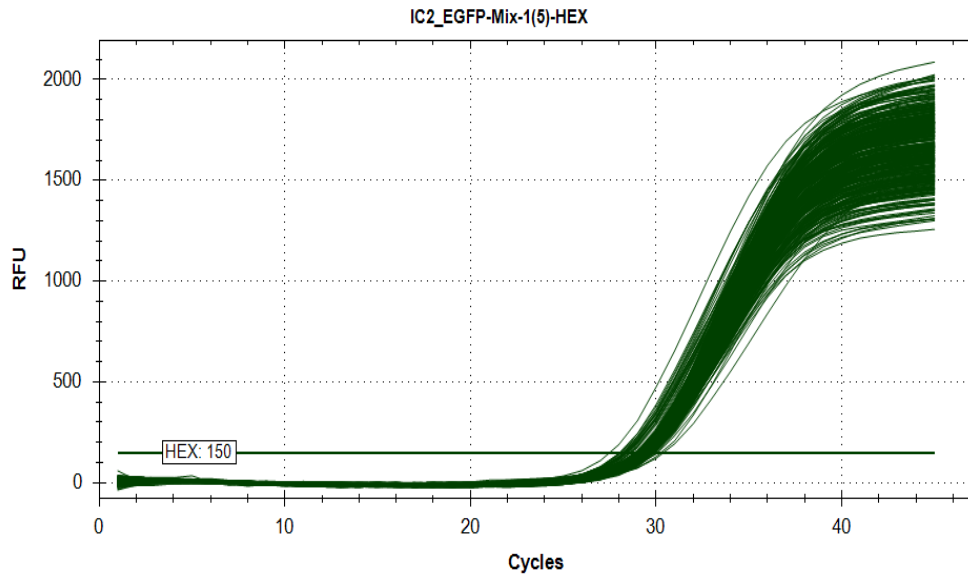
Ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka od 352 krave sa teritorije Savezne Republike Nemačke, ustanovljene su dve krave kod kojih je S/P% vrednost iznosila graničnih 10%.

5.5 Real-Time PCR

Metodom Real-Time PCR analizirano je 289 uzoraka krvi sa EDTA, 232 uzorka briseva nosa, 232 uzorka briseva usta i 80 uzoraka hematofagnih insekata (muva). Kao što je prikazano, na slici 12, izuzev pozitivnih kontrola (Neethling virus, izolata iz Srbije i izolata iz bivše Jugoslovenske Republike Makedonije) ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo genoma virusa nodularnog dermatitisa. Uspešnom amplifikacijom interne kontrole sa rasponom Ct vrednosti od 28,15 do 31,14 (slika 13) u svim uzorcima potvrđena je validnost testa, te isključena inhibicija, od izolacije do amplifikacije DNK.



Slika 12. Grafički prikaz rezultata Real-Time PCR: plava linija – ispitivani uzorci; zelena linija – negativna kontrola, □ - Neethling virus, Δ - terenski soj iz Srbije, ○ –terenski soj iz bivše Jugoslovenske Republike Makedonije



Slika 13. Grafički prikaz amplifikacije interne kontrole

6 Diskusija

Goveda su jedina vrsta prijemčiva za infekciju virusom nodularnog dermatitisa. Vrsta *Bos taurus* je osjetljivija na infekciju u odnosu na *Bos indicus*. Takođe je opisano da azijski bivo (OIE, 2017) kao i neke afričke vrste divljih preživara (Tuppurainen i Oura, 2012) mogu da obole. Goveda visoko produktivnih mlečnih rasa, fine i tanke kože, su osjetljivija u odnosu na druge rase i po pravilu, oboljevaju sa težom kliničkom slikom (OIE, 2017). Međutim, u istom stadu ne dolazi do ispoljavanja jednako teške kliničke slike kod svih jedinki. Klinička slika se kreće od blage do veoma teške, sa smrtnim ishodom (Carn i Kitching, 1995b). Progresivnim širenjem bolesti u protekloj deceniji sa afričkog kontinenta na teritoriju Bliskog Istoka, Male Azije i jugoistočne Evrope, virus nodularnog dermatitisa je po prvi put dijagnostikovao u Republici Srbiji (EFSA, 2017).

Nakon prvog potvrđenog slučaja 07.06.2016. godine u selu Ljiljance, opština Bujanovac preduzete su mere kontrole i eradikacije koje su u prvom redu podrazumevale humano ubijanje goveda, a potom vakcinaciju celokupne populacije goveda (Vidanović i sar., 2016). Vakcinacija celokupne populacije goveda obavljena je u 2016. godini upotrebom atenuirane vakcine Neethling soja, proizvođača Onderstepoort Biological Products iz Južnoafričke Republike. Pozitivni efekti vakcinacije u 2016. godini uočeni su ubrzo nakon početka kampanje, a ogledali su se u smanjenom broju prijavljenih slučajeva. Vakcinacija je bila praćena i pojavom neželjenih efekata koji su se manifestovali pojavom otoka na mestu aplikacije, razvojem nodula, povišenjem telesne temperature i padom mlečnosti (Debeljak i sar., 2017). U kasnijim fazama kontrole bolesti, po završenoj vakcinaciji, eutanazirane su samo životinje kod kojih je sumnja na bolest laboratorijski potvrđena (Vidanović i sar., 2016). Prema preporuci proizvođača vakcine, za održavanje imuniteta stada, potrebno je revakcinisati sva goveda jednom godišnje, odnosno vakcinisati telad sa 6 meseci starosti. Revakcinacija svih goveda vakcinisanih u 2016. godini kao i vakcinacija teladi je sprovedena u 2017. godini upotrebom BOVIVAX LSD-N vakcine (M.C.I. Sante Animale, Maroko). Prema sažetku karakteristika leka odnosno uputstvu proizvođača vakcine, najčešći neželjeni efekat vakcinacije je pojava otoka na mestu aplikacije vakcine. Međutim, kod goveda koja su bila uključena u ovo istraživanje, neželjeni efekti nisu zabeleženi. Na dan vakcinacije sva goveda su klinički pregledana od strane veterinara kako bi samo zdrave životinje bile vakcinisane. Tokom uzorkovanja materijala za ispitivanje nije bilo isključivanja životinja zbog promena zdravstvenog stanja, odnosno pojave vidljivih ili palpabilnih nodula i nespecifičnih kliničkih znakova bolesti.

Pri sprovođenju masovnih kampanja koje podrazumevaju vakcinaciju velikog broja životinja u kratkom vremenskom periodu, jedan broj životinja neće odreagovati na vakcinaciju. Neki od faktora koji mogu da utiču na vakcinaciju su: životinje u fazi inkubacije u trenutku vakcinacije, nehigijenska upotreba igala, kontaminacija rastvarača vakcine, nepropisno skladištenje vakcine (nepoštovanje hladnog lanca, izlaganje vakcine direktnoj sunčevoj svetlosti), subdoziranje vakcine, nepravilna aplikacija vakcine, maternalni imunitet kod mladih životinja između 4 i 6 meseci starosti (Carn, 1993; Kitching, 2003). Pored gore navedenih faktora koji mogu dovesti do toga da imunski sistem životinje ne odgovori na vakcinaciju, upotreba heterolognog soja virusa takođe dovodi do nepotpune zaštite goveda. Neki od primera lošeg imunskog odgovora upotrebom virusa boginja ovaca za vakcinaciju goveda opisani su u Izraelu (Brenner i sar., 2009) i u Etiopiji (Gelaye i sar., 2015) gde je došlo do ponovnog izbijanja bolesti nakon vakcinacije. Uprkos tome što nije bilo novih prijavljenih slučajeva nodularnog dermatitisa u Srbiji, u 2017. godini, ispitivanjem imunskog odgovora dobijen je uvid u efikasnost vakcinacije.

Smatra se da je efikasan imunski odgovor na capripoksviruse predominantno ćelijski posredovan, ali da i humoralni imunski odgovor igra značajnu ulogu (Kitching i sar., 1987; OIE, 2017). Nedavne studije su dokazale da vakcinacija životinja atenuiranim virusom nodularnog dermatitisa dovodi do podjednako dobrog razvoja ćelijskog i humoralnog imunskog odgovora (Abdelwahab i sar., 2016; Norian i sar., 2016; Varshovi i sar., 2018).

Uprkos tome što je ćelijski posredovan imunski odgovor dominantan, detekcija humoralnog imunskog odgovora ima veći praktični značaj zato što daje značajne informacije o uspehu vakcinacije, ali je vremenski ograničen. Prema novijim istraživanjima sprovedenim nakon vakcinacije atenuiranim virusom nodularnog dermatitisa dokazano je, da je detekcija specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa moguća jednu do dve nedelje nakon vakcinacije (Abdelwahab i sar., 2016; Norian i sar., 2016; Varshovi i sar., 2018) pa sve do 40 nedelja nakon vakcinacije (Abdelwahab i sar., 2016).

U ovoj studiji detekcija prisustva specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa nakon vakcinacije je bila moguća 46 do 47 nedelja kod 27 životinja (35,06%) virus neutralizacionim testom i kod 26 životinja (33,77%) testom indirektno imunofluorescencije i ELISA testom. Prema ovim rezultatima detekcija specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa je moguća duži vremenski period kod određenog broja životinja u odnosu na dosadašnja istraživanja.

Ispitivanjem uzoraka krvnih seruma mesec dana nakon revakcinacije uočen je značajan porast broja seropozitivnih životinja, uz istovremeni porast titra antitela što opravdava potrebu za revakcinacijom. Upoređujući rezultate dobijene ispitivanjem uzoraka krvnih seruma mesec dana nakon revakcinacije sa rezultatima dobijenim ispitivanjem uzoraka krvnih seruma pet meseci nakon revakcinacije, 7 životinja je imalo viši titar antitela na virus neutralizacionom testu i više S/P% vrednosti ELISA testa nakon 5 meseci. Pretpostavlja se da je kod ovih 7 životinja rast titra specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa bio produžen, što je uočeno u studiji Abdelwahaba i sar. (2016) gde je titar specifičnih antitela rastao do 12 nedelja nakon vakcinacije.

Uprkos pozitivnom efektu revakcinacije, kod jednog broja životinja specifična antitela nisu detektovana (tabela 6) nakon revakcinacije. Izostanak serokonverzije nakon vakcinacije je već opisan od strane Gari i sar. (2015) gde je upotrebom tri različita atenuirana soja virusa Neethling, KSGP i Gorgon uočena serokonverzija kod svega 50% vakcinisanih životinja dok je serokonverzija nakon veštačke infekcije virusom nodularnog dermatitisa dostigla 80%. Razlog loše serokonverzije je pripisan lošoj imunogenosti vakcine zbog neželjenog stepena atenuacije. Veličina gazdinstava koja su uključena u ovo istraživanje je bila od 2 do 10 životinja, a razdaljina između njih se kretala od 200 do 500 metara. Vakcinacija je obavljena u letnjim mesecima. Uzevši sve navedene činjenice u obzir, moguće je da je vreme potrebno da se vakciniše 25 ili 50 životinja bilo prolongirano, što je dovelo do pada titra vakcinalnog virusa samim tim i lošijeg imunskog odgovora.

Upotreba standardnih seroloških metoda (virus neutralizacionog testa i testa indirektno imunofluorescencije) u cilju detekcije humoralnog imunskog odgovora ima svoje nedostatke jer zahteva upotrebu živog virusa, interpretacija rezultata može biti zahtevna, a i kod testa indirektno imunofluorescencije je opisana unakrsna reakcija sa drugim srodnim virusima (Davis i Otema, 1981; OIE, 2017). Prema OIE-u (2017) virus neutralizacioni test se smatra jedinim validovanim testom za serološku dijagnostiku nodularnog dermatitisa. Pored toga što je za izvođenje testa potrebno nekoliko dana (7 ili 9) rukovanje živim virusom predstavlja rizik i zahteva dobro opremljene laboratorije visokog nivoa biosigurnosti (Tuppurainen, 2017b). Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji test indirektno imunofluorescencije je najosetljiviji test za detekciju specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa u poređenju sa virus neutralizacionim i ELISA testom. Bolja osetljivost testa indirektno imunofluorescencije u odnosu na virus neutralizacioni test je već opisana u studiji Gari i sar. (2008). Rezultati ispitivanja krvnih seruma testom indirektno imunofluorescencije pokazuju usaglašenost sa rezultatima ispitivanja krvnih seruma virus neutralizacionim i ELISA

testom koji su uzorkovani pre revakcinacije i pet meseci nakon revakcinacije. Međutim, testom indirektno imunofluorescencije detektovan je veći broj seropozitivnih životinja ispitivanjem uzoraka krvnih seruma prikupljenih mesec dana nakon revakcinacije u odnosu na rezultate ispitivanja virus neutralizacionim i ELISA testom. Visoka osetljivost testa indirektno imunofluorescencije se može pripisati niskoj specifičnosti testa, i unakrsnoj reakciji sa virusom papularnog stomatitisa i lažnih boginja goveda (Davis i Otema, 1981; OIE, 2017). Davis i Otema (1981) opisali su da ukoliko se za ispitivanje koriste mala početna razblaženja seruma $\leq 1:8$ može doći do unakrsne reaktivnosti sa antitelima na pomenute viruse. Da bi se izbegla unakrsna reaktivnost, uzorci seruma su ispitani u razblaženju 1:40 i višem. Pored toga, nije bilo zabeleženih kliničkih slučajeva infekcija virusom papularnog stomatitisa i virusom lažnih boginja goveda kod životinja uključenih u ovo istraživanje. Viša osetljivost testa indirektno imunofluorescencije u periodu mesec dana nakon revakcinacije, može se tumačiti činjenicom da su u testu korišćeni poliklonski antigoveđi IgG konjugovani fluorescein izotiocijanatom koji mogu da reaguju i sa IgM, jer je opšte poznato da je titar ove klase imunoglobulina najviši na početku imunskog odgovora.

Za određivanje specifičnosti i osetljivosti ELISA testa i testa indirektno imunofluorescencije korišćeni su rezultati dobijeni ispitivanjem krvnih seruma virus neutralizacionim testom koji se smatra referentnim. Međutim, za određivanje specifičnosti i osetljivosti ELISA testa korišćeni su i rezultati dobijeni ispitivanjem krvnih seruma testom indirektno imunofluorescencije. Proizvođačke karakteristike ELISA testa su veoma visoka specifičnost (99,7%) i usaglašenost rezultata sa rezultatima virus neutralizacionog testa. Međutim, prema dobijenim rezultatima osetljivost komercijalnog ELISA testa je 91%, a specifičnost 87%. U odnosu na test indirektno imunofluorescencije, osetljivost je čak niža i iznosi 88%, kao i specifičnost 76%. U studiji Gari i sar. (2008) test indirektno imunofluorescencije je imao bolje performanse osetljivosti od 92% i specifičnosti od 88% u odnosu na rezultate ovog istraživanja gde su dobijene vrednosti osetljivosti iznosile 85% i specifičnosti 86%. Međutim, iako lošijih karakteristika u odnosu na klasične serološke metode, upotreba ELISA testa ima svojih prednosti. ELISA test je lak za izvođenje, ne zahteva upotrebu živog virusa kao ni laboratorije visokog nivoa biosigurnosti, u kratkom vremenskom periodu se može ispitati veliki broj životinja, postoji mogućnost automatizacije, a pri očitavanju rezultata se izbegava subjektivnost analitičara. Pored toga ne postoji statistički značajna razlika između rezultata dobijenih ELISA testom i rezultata klasičnih seroloških testova u odnosu na period uzorkovanja. Međutim, statistički značajna razlika koja je utvrđena između rezultata dobijenih

ispitivanjem krvnih seruma uzorkovanih mesec dana i pet meseci nakon revakcinacije u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem krvnih seruma uzorkovanih pre revakcinacije za sva tri testa, što je posledica same revakcinacije i očekivanog porasta titra antitela u krvnom serumu.

Za dokazivanje specifičnosti ELISA testa ispitani su krvni serumi svinja seropozitivnih na *Suipoxvirus*. Poznato je da *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus* i *Yatapoxvirus* koriste iste proteine u interakciji sa ćelijom domaćina što nije nađeno kod drugih pripadnika *Chordopoxvirinae* podfamilije (Seet i sar., 2003). Uprkos navedenom, svi ispitani uzorci krvnih seruma svinja seropozitivnih na suipoksvirus reagovali su negativno, a S/P% vrednosti su iznosile 0 i 1 što ukazuje na specifičnost ELISA testa za detekciju specifičnih antitela protiv capripoksvirusa.

Placenta preživara koja pripada tipu *epitelioborialis* onemogućava prolazak antitela iz cirkulacije majke u fetalni krvotok, te su kolostralna antitela prva i najvažnija zaštita teladi od infekcije (Godden, 2008). Za maksimalni efekat, potrebno je teletu dati kolostrum bogat imunoglobulinima (>50 mg/ml IgG) neposredno po rođenju, u dovoljnoj količini izbegavajući bakterijsku kontaminaciju ukoliko se tele hrani veštačkim putem (Weaver i sar., 2000; Johnson i sar., 2007; Godden, 2008). U ovom istraživanju telad su hranjena u roku od 30 minuta do 2 sata nakon teljenja sa oko 2 litra kolostruma i u prvih 14 dana nije bilo detektovanih kliničkih znakova bolesti.

Ispitivanjem kolostruma ELISA testom, u 52,94% uzoraka je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa. Kod 81,82% teladi čije su majke imale antitela u kolostrumu, 14. dana starosti, detektovana su antitela u serumu komercijalnim ELISA testom. Međutim, Agianniotaki i sar. (2018) su utvrdili da se pasivno preneti antitela kod teladi mogu najduže detektovati 90 dana, predlažući vakcinaciju teladi ranije od 4 meseca starosti.

Ispitivanje uzoraka mleka (pojedinačnih i zbirnih) se danas uobičajeno koristi za utvrđivanje statusa stada na govedu virusnu dijareju (BVD) (Beaudeau i sar., 2001; Stahl i sar., 2002), enzootsku leukozu goveda (EBL) (Klintevall i sar., 1991) i infektivni rinotraheitis/pustulozni vulvovaginitis (IBR/IPV) (Nylín i sar., 2000; Stahl i sar., 2002). Za razliku od uzorkovanja krvi, uzorkovanje mleka je jednostavnije i neinvazivno po životinju, ne zahteva upotrebu posebne opreme i obučeni kadar. Takođe, za uzorkovanje nije potreban poseban potrošni materijal kojim bi se moralo oprezno rukovati i neškodljivo ga ukloniti kao kod uzorkovanja krvi. Ograničavajući faktor za ispitivanje mleka jeste taj što omogućava ispitivanje samo životinja koje su u laktaciji.

U mleku se mogu naći tri klase imunoglobulina: IgG, IgA i IgM (Korhonen i sar., 2000). Dominantna klasa Ig u mleku je IgG sa udelom od 66%. Koncentracija IgG nije ista u krvnom serumu, kolostrumu i mleku. Najviša koncentracija IgG se nalazi u kolostrumu (32 – 212 mg/ml), zatim u krvnom serumu (25,0 mg/ml) dok je najniža u mleku (0,72 mg/ml) (Larson, 1992). Najviša koncentracija imunoglobulina je u kolostrumu u prvom satu nakon teljenja. Koncentracija IgG pada za 3,7% svakog sata nakon teljenja. Koncentracija IgG u mleku zavisi od: rase, broja laktacija (starosti), laktacionog perioda, ishrane i prisustva kliničkih ili supkliničkih mastitisa (Morin i sar., 2010; Krol i sar., 2012).

Za postizanje maksimalne specifičnosti ELISA testa za ispitivanje mleka, izvršena je ROC analiza dobijenih rezultata i određena optimalna granična vrednost. Rezultati dobijeni ispitivanjem krvnih seruma ELISA testom korišćeni su kao referentni za određivanje optimalne granične vrednosti za ispitivanje uzoraka mleka. Za postavljeni uslov, najoptimalnija S/P% vrednost je bila ≥ 10 . Korišćenjem ove vrednosti uz modifikaciju vremena inkubacije postignuta je bolja osetljivost ELISA testa (osetljivost 63%) u odnosu na rezultate kada se primeni protokol proizvođača (osetljivost 51%). Određivanje Youden indeksa je mera potencijalno maksimalne efikasnosti testa i izračunava se po formuli ($J=Se+Sp-1$). Vrednosti Youden indeksa se kreću od 0 do 1. Ukoliko izračunata vrednost Youden indeksa iznosi 0, to znači da je test neupotrebljiv. Vrednost 1 Youden indeksa imali bi testovi apsolutne osetljivosti i specifičnosti (Youden, 1950). Youden indeks za rezultate dobijene ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka modifikovanim protokolom iznosi 0,7953319 u odnosu na vrednost 0,7854345 koja se dobija ispitivanjem uzoraka mleka prema protokolu proizvođača. Ispitivanjem uzoraka mleka i krvnog seruma od istih životinja ELISA testom, utvrđen je veći broj životinja kod kojih su antitela dokazana samo u serumu. Najusaglašeniji rezultati dobijeni ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem krvnih seruma ELISA testom imale su krave koje su u krvnom serumu imale detektovane visoke S/P% vrednosti i dnevno proizvodile do 15 litara mleka. Prema podacima u literaturi, osetljivost ELISA testa je moguće povećati prečišćavanjem imunoglobulina iz mleka korišćenjem nekog od komercijalnih kitova ili precipitacijom proteina koristeći amonijum sulfat (Wingfield, 2016). Koncentracija IgG pada tokom laktacije, dok je povećanje koncentracije IgG uočeno pred zasušenje bez promena koncentracije u serumu (Morin i sar., 2010). Takođe, mleko poreklom od krava sa većim brojem laktacija ima višu koncentraciju imunoglobulina u odnosu na mleko prvotelki (Morin i sar., 2010; Krol i sar., 2012). Prema rezultatima dobijenim ispitivanjem

pojedinačnih uzoraka mleka, laktacioni period nije imao velikog uticaja na detekciju specifičnih antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa. Porast broja pozitivno detektovanih uzoraka mleka uočen je mesec dana nakon revakcinacije kako prema rezultatima dobijenim ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka tako i prema rezultatima dobijenim ispitivanjem zbirnih uzoraka mleka. Prema Klintevall-u i sar., (1991) mleko krava koje boluju od mastitisa kliničkog ili supkliničkog mogu dati lažno pozitivnu reakciju. Sve krave koje su uključene u ovo istraživanje nisu pokazivale znakove kliničkog mastitisa i prema anamnezi vlasnika nije bilo lečenja u periodu pre uzorkovanja. Mlečna mast je takođe jedan od faktora koji može dovesti do lažno pozitivne reakcije ukoliko se ne ukloni iz mleka (Klintevall i sar., 1991). Kako bi se izbegla detekcija lažno pozitivnih uzoraka svi uzorci mleka su centrifugirani, a za analizu je korišćen tečni deo ispod masnog sloja. Na ovaj način dobijeni su usaglašeni rezultati ispitivanjem krvnih seruma i mleka (slika 11; tabela 22). Statistički značajna razlika i visoka vrednost χ^2 testa u korist rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih uzoraka mleka modifikacijom vremena inkubacije dodatno potvrđuju da ELISA test ima bolje performanse modifikacijom vremena inkubacije za uzorke mleka. Korišćenjem statističkih alata, u ovom istraživanju, utvrđeno je da se bolji rezultati ispitivanja mleka postižu dužom inkubacijom i primenom niže granične vrednosti.

Ispitivanjem zbirnog mleka, utvrđeno je da se komercijalni ELISA test može koristiti za evaluaciju humoralnog imunskog odgovora na nivou stada. Međutim, rezultati zavise od broja seropozitivnih životinja uključenih u zbirni uzorak mleka i koncentracije antitela u mleku. Prema dobijenim rezultatima u ovom istraživanju, ELISA test ima bolje performanse i usaglašenije rezultate sa rezultatima ispitivanja pojedinačnih uzoraka mleka i krvnog seruma kada se primeni modifikovani protokol i za ispitivanje zbirnih uzoraka mleka. Iako ispitivanjem zbirnih uzoraka mleka nisu obuhvaćene sve životinje, periodičnim ispitivanjem ovaj problem se prevazilazi.

U cilju validacije komercijalnog ELISA testa pored uzoraka od vakcinisanih životinja kao negativna kontrola ispitani su pojedinačni uzorci mleka krava poreklom iz Savezne Republike Nemačke. Prema dobijenim rezultatima ispitanih pojedinačnih uzoraka mleka krava poreklom iz Savezne Republike Nemačke 0,6% uzoraka je bilo granične vrednosti. Time je komercijalni ELISA test proizvođača IDvet, ispitivanjem velikog broja uzoraka, validovan za ispitivanje mleka uz modifikaciju protokola razvijenog u ovom istraživanju.

Na osnovu rezultata Real-Time PCR, utvrđeno je da virus nodularnog dermatitisa u ispitivanoj populaciji goveda nije prisutan.

7 Zaključci

1. Antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa su detektovana od 46 do 47 nedelja nakon vakcinacije kod 35,06% životinja VNT i kod 33,77% životinja IFAT i komercijalnim ELISA testom.
2. Očekivano, rezultati svih korišćenih seroloških testova su pokazali da je mesec dana nakon revakcinacije došlo do statistički značajnog povišenja titra antitela u krvnom serumu ispitivanih životinja.
3. Poređenjem rezultata seroloških testova (VNT, IFAT i komercijalni ELISA test) dobijenih za sva tri termina ispitivanja (pre revakcinacije, mesec i pet meseci nakon revakcinacije) nije ustanovljena statistička značajna razlika između testova. S obzirom na to, može se zaključiti da prednost u serološkim ispitivanjima ima komercijalni ELISA test, budući da je lakši za izvođenje, interpretacija dobijenih rezultata je objektivnija i nisu potrebni posebni laboratorijski kapaciteti uključujući i biosigurnost, kao što je slučaj sa VNT i IFAT, zbog rada sa živim virusom nodularnog dermatitisa.
4. U odnosu na standardni VNT, izračunata osetljivost IFAT za ispitivanje krvnih seruma goveda iznosila je 85%, a specifičnost 86%, dok je osetljivost komercijalnog ELISA testa bila 91%, a specifičnost 87%.
5. Poređenjem rezultata komercijalnog ELISA testa sa rezultatima IFAT kao alternativnog testa, ustanovljena je dijagnostička osetljivost od 88%, a specifičnost od 76%.
6. Komercijalni ELISA test je sa uspehom prilagođen i validovan za ispitivanje pojedinačnih i zbirnih uzoraka mleka, a izračunata idealna granična vrednost za uslov maksimalne specifičnosti je bila ≥ 10 S/P%.
7. Modifikacijom protokola za ispitivanje uzoraka mleka u odnosu na preporučeno vreme inkubiranja uzoraka krvnog seruma i plazme, dobijene su više vrednosti dijagnostičke osetljivosti. Iz tog razloga, u slučajevima ispitivanja mleka komercijalnim ELISA testom, preporučuje se inkubiranje uzoraka 24 sata na temperaturi frižidera.
8. Ustanovljen je efikasan pasivni prenos kolostralnih antitela sa majki na telad koji je bio u direktnoj vezi sa S/P% vrednošću koja je dobijena ispitivanjem kolostruma komercijalnim ELISA testom. Od ukupnog broja ispitanih kolostruma, antitela protiv virusa nodularnog dermatitisa ustanovljena su kod 52,94% uzoraka. U odnosu na broj pozitivnih uzoraka

kolostruma, efikasan prenos ustanovljen je kod 81,82% teladi upotrebom komercijalnog ELISA testa.

9. Ispitivanjem pune krvi sa EDTA, briseva nosa i usta nije ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline vakcinalnog ni terenskog soja virusa nodularnog dermatitisa kod vakcinisanih životinja. Virus nije dokazan ni u hematofagnim insektima koji su sakupljani iz okruženja vakcinisanih životinja. Iako se radi o području gde nodularni dermatitis nije dijagnostikovao, može se pretpostaviti da negativni rezultati Real-Time PCR dobijeni na velikom broju ispitanih uzoraka ukazuju da vakcinalni virus ne perzistira u okruženju i ne izlučuje se mesec dana nakon revakcinacije.

8 Literatura

1. 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 in calves and its related to maternal immunity. *Journal of American Science*, 12:38–45
2. Abutarbush, S. M., & Tuppurainen, E. S. M. (2018). Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-7
3. Agianniotaki, E. I., Tasioudi, K. E., Chaintoutis, S. C., Iliadou, P., Mangana-Vougiouka, O., Kirtzalidou, A., Alexandropoulos, T., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Dovas, C. I., & Chondrokouki, E. (2017). Lumpy skin disease outbreaks in Greece during 2015–16, implementation of emergency immunization and genetic differentiation between field isolates and vaccine virus strains. *Veterinary Microbiology*, 201:78–84
4. Agianniotaki, E. I., Babiuk, S., Katsoulos, P. D., Chaintoutis, S. C., Praxitelous, A., Quizon, K., Boscós, C., Polizopoulou, Z. S., Chondrokouki, E. D., & Dovas, C. I. (2018). Colostrum transfer of neutralizing antibodies against lumpy skin disease virus from vaccinated cows to their calves. *Transboundary and Emerging Disease*
5. Ali, A. A., Esmat, M., Attia, H., Selim, A., & Abdelhamid, Y. M. (1990). Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt. *Veterinary Record*, 127:549–550
6. Alexander, R. A., Plowright, W. & Haig, D. A. (1957). Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 5:489-492
7. Annandale, C. H., P. Irons, 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 of Domestic Animals*, 45:250–255
8. Annandale, C. H., Holm, D. E., Ebersohn, K., & Venter, E. H. (2013). Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61:443–448
9. 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*, 58:451-457
10. Babiuk, S., Parkyn, G., Coppins, J., Larence, J. E., Sabara, M. I., Bowden, T. R., Boyle, D. B., & Kitching, R. P. (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of

- capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19:486–491.
11. Babiuk, S., Bowden, T. R., Parkyn, G., Dalman, B., Manning, L., Neufeld, J., Embury-Hyatt, C., Copps, J., & Boyle, D. B. (2008). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55:299-307
 12. Babiuk, S., Wallace, D. B., Smith, S. J., Bowden, T. R., Dalman, B., Parkyn, G., Copps, J., & Boyle, D. B. (2009). Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transboundary and Emerging Disease*, 56:132-141
 13. Babiuk, S. (2018). Diagnostic Tools. In: *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publisher AG part of springer Nature. Cham, Swicerland, pp 73-79
 14. Balinsky, C. A., Delhon, G., Smoliga, G., Prarat, M., French, R. A., Geary, S. J., Rock, D. L., & Rodriguez, L. L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a Real-Time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:438–442
 15. Beaudreau, F., Belloc, C., Seegers, C., Assie, S., Sellal, E., & Joly, A. (2001). Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Veterinary Microbiology*, 80:329-337
 16. Bedeković, T., Šimić, I., Krešić, N., & Lojkić, I. (2017). Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. *Transboundary and Emerging Disease*, 1-6.
 17. 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*, 33:4837-4842
 18. Bowden, T. R., Babiuk, S. L., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371:380-393.
 19. Bowden, T. R., Coupar, B. E., Babiuk, S. L., White, J. R., Boyd, V., Duch, C. J., Shiell, B. J., Ueda, N., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2009). Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 161:19–29
 20. Brenner, J., Haimovitz, M., Oron, E., Stram, Y., Fridgut, O., Bumbarov, V., Kuznetzova, L., Oved, Z., Waserman, A., Garazzi, S., Perl, S., Lahav, D., Edery, N., & Yadin, H. (2006).

- Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61:73-77
21. Brenner, J., Bellaïche, M., Gross, E., Elad, D., Oved, Z., Haimovitz, M., Wasserman, A., Friedgut, O., Stram, Y., Bumbarov, V., & Yadin, H. (2009). Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease: statutory challenge. *Vaccine*, 27:1500-1503
 22. Buller, R. M., Arif, B. M., Black, D. N., Dumbell, K. R., Esposito, J. J., Lefkowitz, E. J., McFadden, G., Moss, B., Mercer, A. A., Moyer, R. W., Skinner, M. A., & Tripathy, D. N. (2005). Family Poxviridae. In: Fauquet, C.M., M.A., Mayo, J., Maniloff, U., Desselberger, L.A., Ball (eds). *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 117–133
 23. Burdin, M. L. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 7, 27–36
 24. Carn, V. M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, 11:1275–1279
 25. 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 capripoxvirus. *Journal of Virological Methods*, 49:285–294
 26. Carn, V. M., & Kitching, R. P. (1995a). An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiology & Infection*, 114:503–513.
 27. Carn, V. M., & Kitching, R. P. (1995b). The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Archives of Virology*, 140:503–513.
 28. Chaudhri, G., Panchanathan, V., Bluethmann, H., & Karupiah, G. (2006). Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *Journal of Virology*, 80:6339–6344
 29. 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*, 126:317–321
 30. 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*, 17:294–300

31. Coetzer, J. A. W. (2004). Lumpy skin disease. In: Coetzer, J.A.W. and R.C. Tustin. Editors. Infectious Diseases of Livestock, 2nd edition, University Press Southern Africa, Oxford, pp. 1268–1276
32. Coetzer, J. A. W., Tuppurainen, E., Babiuk, S., & Wallace, D. B. (2018). Lumpy skin disease. In: Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R., Maclachlan, N. J., & Penrith, M-L., editors. Infectious Diseases of Livestock, Part II. Anipedia, <https://www.researchgate.net/publication/326258692>
33. 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*, 31:253-255
34. Debeljak, Z., Tomić, A., Vasković, N., Rajković, M., Milovanović, M., Petrović, T., Vidanović, D., Šekler, M., Žarković, A., Matović, K., i Kolarević, M. (2017). Kliničke manifestacije nodularnog dermatitisa i postvakcinalne reakcije na teritoriji VSI „Kraljevo“, XIX simpozijum epizootiologa i epidemiologa (19 Epizootiološki dani), Zbornik kratkih sadržaja, Izdavač Sekcija za zoonoze, Srpsko veterinarsko društvo, str. 82-83, ISBN: 978-86-83115-31-0, Vršac, Srbija, 5. – 7. April 2017
35. De Lange, M. (1959). The histopathology of the cytopathogenic changes produced in monolayer epithelial cultures by viruses associated with lumpy skin disease. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 28:245
36. Dietze, K., Moritz, T., Alexandrov, T., Krstevski, K., Schlottau, K., Milovanovic, M., & Hoffmann, B. (2018). Suitability of group-level oral fluid sampling in ruminant population for lumpy skin disease virus detection. *Veterinary Microbiology*, 221:44-48
37. EFSA. (2017). Lumpy skin disease: I. Data collection and analysis. *EFSA Journal*
38. EFSA. (2018). Lumpy skin disease: II. Data collection and analysis. *EFSA Journal*
39. El-Kholy, A. A., Soliman, H. M. T., & Abdelrahman, K. A. (2008). Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of a recent lumpy skin disease virus infection to Egypt. *Arabian Journal of Biotechnology*, 11:293-302
40. EUR-Lex, Access to European Union law. Council Directive 92/119/EEC of 17 December 1992 introducing general Community measures for the control of certain animal diseases and specific measures relating to swine vesicular disease. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:01992L0119-20090618>

41. FAO. (2017). Sustainable prevention, control and elimination of Lumpy Skin Disease – Eastern Europe and the Balkans. FAO Animal Production And Health Position Paper. No. 2. rome, italy
42. Gari, G., Biteau-Coroller, F., Le Goff, C., Caufour, P., & Roger, F. (2008). Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary Microbiology*, 129:269-280
43. Gari, G., Abie, G., Gizaw, D., Wubete, A., Kidane, M., Asgedom, H. (2015). Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine*, 33:3256–3261
44. Gelaye, E., Lamien, C. E., Silber, R., Tuppurainen, E. S., Grabherr, R., & Diallo, A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One* 8:e75971
45. Gelaye, E., Belay, A., Ayelet, G., Jenberie, S., Yami, M., Loitsch, A., Tuppurainen, E., Grabherr, R., Diallo, A., & Lamien, C. E. (2015). Capripox disease in Ethiopia: genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antiviral Research*, 119:28–35
46. Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24:19-39
47. Gottlieb, Y. (2018). Vector surveillance and control. In: *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publisher AG part of springer Nature. Cham, Swicerland, pp. 99-102
48. Haig, D. A. (1957). Lumpy skin disease. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 5:421-430
49. Heine, H. G., Stevens, M. P., Foord, A. J., & Boyle, D. B. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of Immunological Methods*, 227:187–196
50. Henning, P. D. (1956). *Animal diseases in South Africa*, 3rd edition, C.N.A., Cape Town.
51. Hoffmann, B., Depner, K., Schirmeier, H., & Beer, M. (2006). A universal heterologous internal control system for duplex Real-Time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *Journal of Virological Methods*, 136:200-209
52. Ireland, D. C., & Binopal, Y. S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *Journal of Virology Methods*, 74:1–7
53. Irons, P. C., Tuppurainen, E. S., & Venter, E. H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, 63:1290–1297

54. Johnson, J. L., Godden, S. M., Molitor, T., Ames, T., & Hageman, D. (2007). Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 90:5189-5198
55. Kara, P. D., Afonso, C. L., Wallace, D. B., Kutish, G. F., Abolnik, C., Lu, Z., Vreede, F. T., Taljaard, L. C., Zsak, A., Viljoen, G. J., & Rock, D. L. (2003). Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of lumpy skin disease virus. *Archive of Virology*, 148:1335–1356
56. Katsoulos, P. D., Chaintoutis, S. C., Dovas, C. I., Polizopoulou, Z. S., Brellou, G. D., Agianniotaki, E. I., Tasioudi, K. E., Chondrokouki, E., Papadopoulos, O., Karatzias, H., & Boscos, C. (2017). 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 Emerging Disease*, 65:174-185
57. Kitching, R. P. (1986). Passive protection of sheep against capripoxvirus. *Research in Veterinary Science*, 41:247–250
58. Kitching, R. P., & Smale, C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Research in Veterinary Science*, 41:425–427
59. 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*, 42:53–60
60. Kitching, R. P. (2003). Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Developments in Biologicals (Basel)*, 114:161–167
61. Klement, E. (2018). Slaughter of Infected and In-Contact Animals. In: *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publisher AG part of springer Nature. Cham, Swicerland, pp. 95-96
62. Klintevall, K., Naslund, K., Svedlund, G., Hajdu, L., Linde, N., & Klingeborn, B. (1991). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in milk and serum. *Journal of Virological Methodes*, 33:319-333
63. Korhonen, H., Marnila, P., & Gill, H. S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors: A review. *British Journal of Nutrition*, 84:S75–S80
64. Krol, J., Litwinczuk, Z., Brodziak, A., & Barłowska, J. (2012). Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G in bovine milk. A search for antibacterial agents edited by Varaprasad Bobbarala Copyright © 2012 In *Tech*, 7, pp. 107-124.

65. Lamien, C. E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijevic, M., Luckins, A.G., & Diallo, A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods*, 171:134–140
66. Larson, B. L. (1992). Immunoglobulins of the mammary secretions. In: Fox P.F., editor. *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*. Elsevier, London, New York, pp. 231
67. Le Goff, C., Lamien, C. E., Fakhfakh, E., Chadeyras, A., Aba-Adulugba, E., Libeau, G., Tuppurainen, E., Wallace, D. B., Adam, T., Silber, R., Gulyaz, V., Madani, H., Caufour, P., Hammami, S., Diallo, A., & Albina, E. (2009). Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *Journal of General Virology*, 90:1967–1977
68. Lubinga, J. C., Tuppurainen, E. S., Stoltz, W. H., Ebersohn, K., Coetzer, J. A., & 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*, 61:129–138
69. Lubinga, J. C., Tuppurainen, E. S., Mahlare, R., Coetzer, J. A., Stoltz, W. H., & Venter, E. H. (2015). Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62:174–182
70. Mac-Donald, R. A. S. (1931). Pseudo-urtricia of cattle. Northern Rhodesia Department of Animal Health, Annual Report 1930, pp. 20-21.
71. Menasherow, S., Rubinstein-Giuni, M., Kovtunenکو, A., Eynգor, Y., Fridgut, O., Rotenberg, D., Khinich, Y., & Stram, Y. (2014). Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV). *Journal of Virological Methods*, 199:95–101
72. Menasherow, S., Erster, O., Rubinstein-Giuni, M., Kovtunenکو, A., Eynգor, E., Gelman, B., Khinich, E., Stram. & Y. (2016). A high-resolution melting (HRM) assay for the differentiation between Israeli field and Neethling vaccine lumpy skin disease viruses. *Journal of Virological Methods*, 232:12–15
73. Ministarstvo poljopriverede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016a). Instrukcija o postupku donošenja rašenja o prestanku mera na zaraženim gazdinstvima, zaraženom i ugroženom području zbog pojave nodularnog dermatitisa, Bograd, broj: 323-02-2433/2016-05/7.
http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/Instrukcija%20o%20postupku%20donosenja%20resenja%20o%20prestanku%20mera%20na%20zarazenim%20gazdinstvima%20zbog%20pojave%20ND.pdf

74. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016b). Regionalnim kriznim centrima: Procedura o načinu postupanja u cilju potvrde slučajeva nodularnog dermatitisa prilikom sprovođenja vakcinacije, Beograd, broj: 323-02-2433/2016-05/6.http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/Procedura%20o%20nacinu%20postupanja%20u%20cilju%20potvrde%20slucaja%20ND%20prilikom%20sprovodjenja%20vakcinacije.pdf
75. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Uprava za veterinu. (2016c). Rešenje, Beograd, broj: 119-01-277/2016-05/10. http://www.vet.minpolj.gov.rs/aktuelnosti/nodularni_dermatitis/resenje%20o%20zabrani%20prometa%20i%20javnog%20okupljanja.pdf
76. Morin, D. E., Nelson, S. V., Reid, E. D., Nagy, D. W., Dahl, G. E., & Constable. P. D. (2010). Effect of colostrum volume, interval between calving and first milking, and photoperiod on colostrum IgG concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 237:420-428
77. Morris, J. P. A. (1931). Pseudo-urtricularia. Northern Rhodesia Department of Animal Health, Annual Report 1930, pp. 12
78. Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, 344:48–54
79. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary virology*, 3rd edition. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 282
80. Norian, R., Afzal, A. N., Varshovi, H. R., & Azadmehr, A. (2016). Evaluation of Humoral And Cell-mediated Immunity of Two Capripoxvirus Vaccine Strain against Lumpy Skin Disease Virus. *Iran Journal of Virology*, 10:1-11
81. Nylin, B., Stroger, U., & Ronsholt, L. (2000). A retrospective evaluation of a Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 47:91-105
82. Office International des Epizooties. (2017). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.4.13, Lumpy Skin Disease. OIE, Paris
83. Office International des Epizooties. (2018). *Terrestrial Animal Health Code – 11/12/2018*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/glossaire.pdf
84. Orlova, E. S., Shcherbakova, A. V., Diev, V. I., & Zakharov, V. M. (2006). Differentiation of capripoxvirus species and strains by polymerase chain reaction. *Molecular Biology*, 40:158–164

85. 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*, 80:6333–6338
86. Prozesky, L., & Barnard, B. J. H. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 49:167–175.
87. Rouby, S., & Aboulsoud, E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *The Veterinary Journal*, 209:193-195
88. Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annual Review of Immunology*, 21:377–423
89. Stahl, K., Rivera, H., Vagsholm, I., & Moreno-Lopez, J. (2002). Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, 56:193-202
90. Stubbs, S., Oura, C. A., Henstock, M., Bowden, T. R., King, D. P., & Tuppurainen, E. S. (2012). Validation of a high-throughput Real-Time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *Journal of Virological Methods*, 179:419–422
91. Spearman, C., & Kaerber, G. (1974). Titerbestimmung (determination of titer). In: Bibrack B, Wittmann G (eds) *Virologische Arbeitsmethoden*. Stuttgart, Fischer Verlag, pp. 37–39
92. Tasioudi, K. E., Antoniou, S. E., Iliadou, P., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Agianniotaki, E., Fouki, C., Mangana-Vougiouka, O., Chondrokouki, E., & Dile, C. (2016). Emergence of Lumpy Skin Disease in Greece, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63:260-265
93. The Center for Food Security & Public Health. (2017). Lumpy skin disease, Neethling, Knopvelsiekte. 1-5. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lumpy_skin_disease.pdf
94. Thomas, A. D., Robinson, E. M., & Alexander, R. A. (1945). Lumpy skin disease: Knopvelsiekte. Onderstepoort, Division of Veterinary Services, Veterinary Newsletter No. 10
95. Timurkan, M. O., Ozkaraca, M., Aydın, H., & Sağlam, Y. S. (2016). The detection and molecular characterization of lumpy skin disease virus, northeast Turkey. *International Journal of Veterinary Science*, 5:44–47
96. Tulman, E. R., Alfonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of Virology*, 71:22-7130

97. Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J. H., Sandybaev, N. T., Kerembekova, U. Z., Zaitsev, V. L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2002). The genomes of sheepox and goatpox viruses. *Journal of Virology*, 76:6054–6061
98. Tuppurainen, E. S. M., 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*, 72:153–164
99. Tuppurainen, E. S., & Oura, C. A. (2012). Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59:40–48
100. Tuppurainen, E. S. M., Lubinga, J. C., Stoltz, W. H., Troskie, M., Carpenter, S. T., Coetzer, J. A. W., Venter, E. H., & Oura, C. A. L. (2013a). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. *Epidemiology & Infection*, 141:425-430
101. Tuppurainen, E. S., Lubinga, J. C., Stoltz, W. H., Troskie, M., Carpenter, S. T., Coetzer, J. A., Venter, E. H., & Oura, C. A. (2013b). Evidence of vertical transmission of lumpy skin disease virus in *Rhipicephalus decoloratus* ticks. *Ticks and tick-borne diseases* 4:329–333
102. Tuppurainen, E. S., Pearson, C. R., Bachanek-Bankowska, K., Knowles, N. J., Amareen, S., Frost, L., Henstock, M. R., Lamien, C. E., Diallo, A., & Mertens, P. P. (2014). Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antivirus Research*, 109:1–6
103. Tuppurainen, E., Alexandrov, T., Beltrán-Alcrudo, D. (2017a). Lumpy skin disease field manual: a manual for veterinarians. *FAO Animal Production and Health Manual No. 20*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 60 p
104. Tuppurainen, E. (2017b). Diagnostic assays for the detection of lumpy skin disease virus and antibodies. *EMPRES*, 47:7-9
105. Tuppurainen, E. (2018a). Geographic Distribution of Lumpy Skin Disease. In: *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publisher AG part of springer Nature. Cham, Swicerland, pp. 11-13
106. Tuppurainen, E., Babiuk, S., & Kllement, E. (2018b). Control and Eradication. In: *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publisher AG part of springer Nature. Cham, Swicerland, pp. 82-109

107. Tuppurainen, E. (2018c). Active and Passive Surveillance. In: Lumpy Skin Disease. Springer International Publisher AG part of Springer Nature. Cham, Switzerland, pp. 107-109
108. Van Rooyen, P. J., Kumm, N. A. L., & Weiss, K. E. (1969). The optimal conditions for the multiplication of Neethling-type lumpy skin disease virus in embryonated eggs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 36:165–174
109. Varshovi, H. R., Norian, R., Azadmehr, A., & Ahangaran, N. A. (2018). Immune response characteristic of Capri pox virus vaccines following emergency vaccination of cattle against lumpy skin disease virus. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 9:33-40
110. 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 Belgrade*, 66:444-454
111. Von Backstrom, U. (1945). Ngamiland cattle disease: preliminary report on a new disease, the aetiological agent being probably of an infectious nature. *Journal of South African Veterinary Association*, 16:29-35
112. Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E., & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:569-577
113. Weiss, K. E. (1968). Lumpy skin disease virus. In: Gard S, Hallauer G, Meyer KF, editors. *Virology Monographs 3*. Wien: Springer-Verlag GmbH, pp. 111-131
114. Wingfield, P. T. (2016). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 84:A.3F.1-A.3F.9
115. World Organisation for Animal Health (OIE). (2017). Aetiology epidemiology diagnosis prevention and control references. OIE Paris. 1-5. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docS/P%df/Disease_cards/LUMPY_SKIN_DISEASE_FINAL.pdf
116. Yeruham, I., Perl, S., Nyska, A., Abraham, A., Davidson, M., Haymovitch, M., Zamir, O., & Grinstein, H. (1994). Adverse reaction in cattle to capripox vaccine. *Veterinary Record*, 135:330-332
117. Youden W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3:32–35.

118. Zeynalova, S., Asadov, K., Guliyev, F., Vatani, M., & Aliyev, V. (2016). Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan. *Frontiers in Microbiology*, 7:1022

Lista skraćenica

CPE – Citopatogeni efekat

DIVA – Differentiating Infected from Vaccinated Animals

DMEM - Dulbeco minimalna esencijalna podloga sa dodatkom Erlovih soli (Dulbecos Minimum essential medium)

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – Etilendiaminotetrasirćetna kiselina

ELISA – Imunoenzimska imunološka metoda

FBS – Fetalni goveđi serum

FITC – Fluorescein izotiocijanat

GTPV – Virus boginja koza

IC2-DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina interne kontrole

IFAT – Test indirektne imunofluorescencije

ND – Nodularni dermatitis

NDV – Virus nodularnog dermatitisa

MDBK – Čelijska linija poreklom od bubrega goveda (Madin-Darby bovine kidney)

NaN₃ – Natrijum azid

OD – Optička gustina

OIE – Svetska organizacija za zdravlje životinja

PBS – Fosfatni slani pufer

Real-Time PCR – Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

ROC - Receiver operating characteristic

Se – Osetljivost

Sp – Specifičnost

S/P% - Procenat pozitivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu

SPPV – Virus boginja ovaca

TCID – Tkivna infektivna jedinica virusa (Tissue Culture Infectious Dose)

VNT – Virus neutralizacioni test

Lista slika

Slika 1. Šematski prikaz capripoksvirusnih čestica (preuzeto sa: <https://viralzone.expasy.org/152>)

Slika 2. Karakterističan izgled nodula na koži levo i sluzokoži desno, Srbija 2016. godine (foto M. Milovanović, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija i Specijalistički veterinarski institut „Kraljevo“, Kraljevo, Srbija; Projekat TR 31088)

Slika 3. Predilekciona mesta pojave nodula nakon prirodne infekcije goveda, Srbija 2016. godine (foto M. Milovanović, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija i Specijalistički veterinarski institut „Kraljevo“, Kraljevo, Srbija; Projekat TR 31088)

Slika 4. Šematski prikaz ploče sa ispitivanim uzorcima krvnih seruma VN testom

Slika 5. Šematski prikaz ploče sa kontrolnom titracijom radnog razređenja virusa i pozitivnim i negativnim kontrolnim krvnim serumima VN testa

Slika 6. Šematski prikaz ploče sa ispitivanim, pozitivnim i negativnim kontrolnim krvnim serumom testa indirektno imunofluorescencije. NI* - neinokulisani redovi; IS* - ispitivani krvni serum; poz ser* - pozitivan kontrolni krvni serum; neg Ser* - negativni kontrolni krvni serum

Slika 7. Izgled pozitivne reakcije imunofluorescencije na fluorescentnom mikroskopu

Slika 8. Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvnih seruma ELISA testom u odnosu na vreme uzorkovanja. A – životinje koje su reagovala negativno nakon prvog uzorkovanja; B – životinje koje su reagovala pozitivno nakon prvog uzorkovanja; crvena linija – granična vrednost $S/P\% \geq 30$

Slika 9. Grafički prikaz ROC krive za zadati uslov maksimalne specifičnosti za rezultate dobijene protokolom proizvođača

Slika 10. Grafički prikaz ROC krive za zadati uslov maksimalne specifičnosti za rezultate dobijene modifikacijom vremena inkubacije

Slika 11. Prikaz odnosa $S/P\%$ vrednosti ispitanih pojedinačnih uzoraka mleka protokolom proizvođača i modifikovanim protokolom u odnosu na detektovane $S/P\%$ vrednosti ispitivanih krvnih seruma. Plava linija – granična vrednost za uzorke krvnih seruma $S/P\% \geq 30$; crvena linija – granična vrednost za pojedinačne uzorke mleka $S/P\% \geq 10$

Slika 12. Grafički prikaz rezultata Real-Time PCR: plava linija – ispitivani uzorci; zelena linija – negativna kontrola, □ - Neethling virus, Δ - terenski soj iz Srbije, ○ –terenski soj iz bivše Jugoslovenske Republike Makedonije

Slika 13. Grafički prikaz amplifikacije interne kontrole

Lista Grafikona

Grafikon 1. Zbirni prikaz broja detektovanih seropozitivnih i seronegativnih životinja korišćenjem tri testa prema vremenu uzorkovanja

Grafikon 2. Poređenje rezultata dobijenih ispitivanjem krvnih seruma (granična vrednost S/P% ≥ 30) i pojedinačnih uzoraka mleka sa dva vremena inkubacije i graničnom vrednošću S/P% ≥ 10 u odnosu na period uzorkovanja

Biografija

Milovan Milovanović je rođen 14.7.1989. godine, u Kraljevu, Republika Srbija. Završio je osnovnu i srednju poljoprivredno-hemijsku školu „Dr Đorđe Radić“ u Kraljevu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2008/2009. godine i diplomirao jula meseca 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,20. Iste godine je upisao doktorske akademske studije i položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,73.

Od 2015. godine je zaposlen kao istraživač pripravnik na projektu koji finansira Ministarstvo prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ TR31088, na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Doktorand Milovan Milovanović se usavršavao u Veterinarskom specijalističkom institutu „Kraljevo“ u Kraljevu, Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu i institutu Fridrih-Lefler kao DAAD stipendista (kratki istraživački boravci).

Do sada je kao autor i koautor objavjavo 18 radova od kojih su četiri publikovana u međunarodnim časopisima sa SCI liste, a dva u časopisima nacionalnog značaja. Ostali radovi su objavljeni na skupovima nacionalnog i međunarodnog karaktera.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Милован Миловановић

број уписа: 14/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Испитивање имунског одговора и присуства теренског и вакциналног соја вируса нодуларног дерматитиса код говеда и новорођене телади након вакцинације атенуираном вакцином"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2019.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милован Миловановић

Број уписа: 14/15

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада **"Испитивање имунског одговора и присуства теренског и вакциналног соја вируса нодуларног дерматитиса код говеда и новорођене теладии након вакцинације атенуираном вакцином"**

Ментори: Др Соња Радојичић, редовни професор

Др Весна Милићевић, научни сарадник

Потписани: Милован Миловановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2019.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Испитивање имунског одговора и присуства теренског и вакциналног соја вируса нодуларног дерматитиса код говеда и новорођене телади након вакцинације атенуираном вакцином"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2019.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.