

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**  
**KATEDRA ZA ZARAZNE BOLESTI ŽIVOTINJA I BOLESTI PČELA**

**Vesna M. Milićević**

**ISPITIVANJE RAŠIRENOSTI  
VIRUSNIH BOLESTI ENZOOTSKOG POTENCIJALA  
KOD DIVLJIH SVINJA (*SUS SCROFA*)  
|  
ANALIZA RIZIKA U REGIONU CENTRALNE SRBIJE**

**- Doktorska disertacija -**

**Beograd, 2016. godine**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL INFECTIOUS DISEASES AND HONEY BEE**  
**DISEASES**

**Vesna M. Milicevic**

**PREVALENCE OF ENZOOTIC VIRAL DISEASES IN**  
**WILD BOAR (*SUS SCROFA*)**  
**AND**  
**RISK ANALYSIS FOR CENTRAL SERBIA REGION**

**- Doctoral Thesis -**

**Belgrade, 2016.**

**Mentor:**

Dr sc. Sonja Radojičić, redovni profesor, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Članovi Komisije:**

Dr sc. Miroslav Valčić, redovni profesor, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr sc. Vladimir Ivović, docent, Fakultet za matematiku, prirodne nauke i informacione tehnologije, Koper, Univerzitet u Primorskoj, Republika Slovenija

**Datum odbrane:**

jul 2016.

## **Ispitivanje raširenosti virusnih bolesti enzootskog potencijala kod divljih svinja (*Sus Scrofa*) i analiza rizika u regionu centralne Srbije**

### **Rezime**

U ovoj disertaciji ispitano je prisustvo i raširenost virusnih bolesti enzootskog potencijala kod divljih svinja kao i analiza rizika od širenja bolesti sa divljih na domaće svinje. Istraživanjem su obuhvaćene divlje svinje iz 10 okruga centralne Srbije: beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog.

Za utvrđivanje prisustva virusnih bolesti kod divljih svinja ispitano je po 200 uzoraka krvnih seruma za svaku godinu u periodu od 2012. do 2014. na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus - PRRSV), Aujeckijeve bolesti (Pseudorabies virus - PRV), parvovirusa svinja (Porcine Parvovirus - PPV), cirkovirusa 2 svinja (Porcine Circovirus 2 - PCV2), virusa influence svinja (Swine Influenza Virus) i virusa transmisivnog gastroenteritisa/respiratornog Coronavirusa svinja (TGEV/PRCV). Ustanovljeno je da su Aujeckijeva bolest, parvoviroza i cirkoviroza tip 2 enzootske bolesti kod divljih svinja: prosečna seroprevalencija za tri godine je najviša za Aujeckijevu bolest (66%), zatim za PPV (47%) i PCV2 infekciju (16%). Ispitivanjem nivoa i odnosa IgG i IgM antitela, utvrđena je aktivna PCV2 infekcija u rasinskom i zlatiborskom okrugu. Budući da je serokonverzija kod mladih divljih svinja otkrivena tek u 2014. godini, pretpostavlja se da je u zlatiborski okrug PCV2 unet tek 2014. godine. Ispitivanjem krvnih seruma, ustanovljeno je da je populacija divljih svinja sa područja 10 ispitanih okruga slobodna od PRRS-a, influence svinje i TGE/PRCV infekcije.

Za dokazivanje uzročnika navedenih bolesti, ispitano je 50 uzoraka organa divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti. PCR metodom dokazano je prisustvo genoma virusa Aujeckijeve bolesti kod 13 divljih svinja. Na ćelijskoj liniji PK15, virus je izolovan iz 4 uzorka. Filogenetskom analizom nukleotidnih sekvenci za tri gena, us4,

us9 i ul49,5, utvrđena je srodnost virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih iz domaćih životinja i divljih svinja, ali i različito poreklo ovih virusa. Uz to, ustanovljeno je da je virus Aujeckijeve bolesti izolovan iz divljih svinja najbližnji visokopatogenom Kaplan soju i da ne potiče od vakcinalnog Bartha soja. Na osnovu seroloških i virusoloških ispitivanja i podataka o starosti divljih svinja, pretpostavlja se da je infekcija virusom Aujeckijeve bolesti u braničevskom i zaječarskom okrugu u periodu uzorkovanja bila aktivna i uzrok ispoljenih znakova bolesti (depresija, otežano disanje, gubitak straha od ljudi). Istraživanjem odnosa pojave bolesti i gustine populacija divljih i domaćih svinja, utvrđena je pozitivna korelacija između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije divljih svinja. Pokazano je da, pored gustine populacije, pol i starost životinja utiču na pojavu Aujeckijeve bolesti što je u skladu sa različitim načinom života solitarnih mužjaka i ženki koje žive u grupama.

Budući da su Aujeckijeva bolest, PPV i PCV2 infekcije dokazane kod divljih svinja, izvršena je analiza rizika od prenošenja uzročnika ovih bolesti sa divljih na domaće svinje. Visok rizik za širenje Aujeckijeve bolesti je utvrđen u borskom, raškom i zlatiborskom okrugu dok je rizik u ostalim okruzima srednji. Rizik od prenošenja PPV infekcije je visok za zaječarski okrug i srednji za ostala područja, dok je rizik od širenja PCV2 infekcije sa divljih na domaće svinje za sve okruge umeren.

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju doprinos poznavanju epizootiološke situacije kod divljih svinja, koja se, s obzirom na odsustvo influence svinja, TGE/PRCV infekcije i PRRS-a, i stabilno stanje Aujeckijeve bolesti, parvoviroze i cirkoviroze tip 2, u ispitivanom periodu može smatrati povoljnom.

**Ključne reči:** divlje svinje, PRRS, Aujeckijeva bolest, PPV, PCV2, SIV, TGE/PRCV, analiza rizika

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

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

**UDK:** 576.89 : 636.09 : 619.595

## **Prevalence of Enzootic Viral Diseases in Wild Boar (*Sus Scrofa*) and risk analysis for Central Serbia Region**

### **Abstract**

In this doctoral thesis, we investigated prevalence of Enzootic Viral Diseases in Wild Boar. For established diseases, risk analysis was further performed. This investigation included 10 regions from central Serbia: Beogradski, Borski, Branicevski, Moravicki, Pomoravski, Rasinski, Raski, Sumadijski, Zajecarski and Zlatiborski.

For each of three years in the period 2012-2014, 200 serum samples were selected for testing on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Pseudorabies virus (PRV), Porcine Parvovirus (PPV), Porcine Circovirus 2 (PCV2), Swine Influenza Virus (SIV), and Transmissible Gastroenteritis/Porcine Respiratory Coronavirus (TGEV/PRCV) specific antibody. It was shown that PRV, PCV2 and PPV infections are enzootic diseases in wild boar: average seroprevalence for three years was highest for PRV infection (66%), then for PPV (47%) and PCV2 infection (16%). Evaluating level and relation between IgG and IgM antibodies, active PCV2 infection was discovered in Zlatiborski and Rasinski region. Since seroconversion in young animals occurred in 2014, we presume that PCV2 entered zlatiborski region in this year. Serology results showed that in this period and regions, wild boar were free from SIV, PRRS and TGE/PRC infections.

In order to detect causal agents, 50 tissue samples originated from wild boars showing signs of illness were tested. Genome of PRV was detected in 13 samples. PRV was isolated on PK15 cell line from 4 samples. Phylogenetic analysis based on three partial sequences for us4, us9 and ul49,5 showed close relationships between PRV isolates from domestic animals and wild boars, but different origin of these viruses. Isolates from wild boar showed the highest similarity to high pathogenic Kaplan strain, and excluded possible origin from vaccinal Bartha strain. Combining laboratory results and age of positive wild boars, it was presumed that Aujeszky's disease virus infection was active in branicevski and zajecarski region and the cause of illness of

wild boars which had manifested depression, dyspnea, no fear from humans. Positive correlation between prevalence and population density was determined for Aujeszky's disease. Also, Aujeszky's disease was dependent on sex and age of wild boars, what was related to different lifestyles of males and females.

Since PRV, PCV2 and PPV were present in wild boar, risk analysis for these three diseases was performed. High risk of spreading Aujeszky's disease from wild to domestic pigs was estimated for raski, zlatiborski and borski region, but medium for the rest of regions. Risk of PPV spreading was estimated as highest for zajecarski and medium for 9 other regions. PCV2 risk for all regions was medium.

This work is a contribution to knowledge of epizootic situation in wild boar, which is, based on our results, favourable.

**Keywords:** wild boar, Aujeszky disease, TGE/PRCV, PRRS, PCV2, PPV, SIV, risk analysis

**Science area:** Veterinary Medicine

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

**UDK:** 576.89 : 636.09 : 619.595

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	6
2.1. O DIVLJIM SVINJAMA.....	6
2.2. VIRUSNE BOLESTI DIVLJIH SVINJA ENZOOTSKOG POTENCIJALA.....	13
2.3. ULOGA I UTICAJ DIVLJIH SVINJA NA KONTROLU ZARAZNIH BOLESTI KOD DOMAĆIH SVINJA I ANALIZA RIZIKA OD NJIHOVOG PRENOŠENJA SA DIVLJIH NA DOMAĆE SVINJE.....	49
3 CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	55
4. MATERIJAL I METODE.....	56
4.1 MATERIJAL.....	56
4.2 METODE.....	59
5. REZULTATI.....	81
5.1. REZULTATI ISPITIVANJA PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA U KRVNIM SERUMIMA DIVLJIH SVINJA U PERIODU 2012 – 2014. GODINE.....	81
5.2. REZULTATI ISPITIVANJA UZORAKA BOLESNIH DIVLJIH SVINJA.....	94
5.3. GEOGRAFSKO POZICIONIRANJE I ANALIZA RIZIKA.....	108
6 DISKUSIJA.....	126
7 ZAKLJUČCI.....	147
8 LITERATURA.....	149





Autor slike: Benoit Clarys, Muzej u Luksemburgu

## 1. UVOD

Bolesti koje se danas smatraju novim i pretećim proističu iz složenog odnosa između ljudi, domaćih i divljih životinja. Za proučavanje njihovog nastanka, prenošenja i širenja potrebno je utvrditi vezu ova tri učesnika.

Infektivne bolesti mogu uticati na divlje životinje tako što smanjuju njihovu brojnost do nivoa da, udružene sa drugim faktorima, postaju ugrožene. Ukoliko se infektivne bolesti posmatraju kao pretnja očuvanju vrsta, onda biodiverzitet može biti sačuvan sprečavanjem njihovih pojava.

Tri četvrtine svih pretećih infektivnih bolesti ljudi su zoonoze. Većina njih potiče od divljih životinja.

Divlje životinje su rezervoari i nezoonoznih bolesti koje mogu uticati na stočarsku proizvodnju i ekonomiju zemalja.

Porast učestalosti pojavljivanja pretećih bolesti kod divljih životinja otvara nova pitanja o njihovoj patogenezi i epizootiologiji i predstavlja prioritet za iznalaženje efikasnih mera kontrole i suzbijanja. Ovo podrazumeva potrebu za nadzorom infektivnih bolesti kod divljih životinja novim i efikasnijim metodama kojima se omogućava analiziranje i mapiranje rizika od prenošenja bolesti između divljih i domaćih životinja i ljudi.

Mere koje preduzimaju ljudi u cilju nadzora i upravljanja infektivnim bolestima divljih životinja ne smeju da se negativno odražavaju na biodiverzitet i zdravlje životinja, već suprotno, treba da deluju sinergistički na njihovo očuvanje.

U prirodi, lokalizacija i pojava bolesti je određena faktorima:

1. povezanim sa domaćinom,
2. povezanim sa uzročnikom i
3. sredine (klima, topografija, zemljište, voda, biotički faktori-flora i fauna).

Karakterizacija uslova sredine skopčanih sa pojavom i širenjem bolesti je važan elemenat epizootiologije zaraznih bolesti divljih životinja. Praćenje infektivnih bolesti kod divljih životinja se sprovodi u cilju:

1. utvrđivanja rizika od prenošenja bolesti na domaće životinje,
2. potvrde odsustva bolesti i
3. otkrivanja zoonoza.

Posedovanjem informacija o prisustvu, raširenosti i trendu pojavljivanja zaraznih bolesti kod divljih životinja omogućava se upravljanje rizikom od njihovog prenošenja, predviđanje prostornog i vremenskog širenja, kao i otkrivanje načina na koji se one šire. Upoznavanje epizootiološke situacije treba da prethodi i bude osnova za donošenje odluka o značaju i potrebi uvođenja programa prismotre ili eradikacije zaraznih bolesti.

Divlje svinje su prijemčive za širok spektar infektivnih i parazitskih bolesti. Neke od njih su ograničene samo na vrstu *Sus Scrofa*, ali većina ih je zajednička za druge životinjske vrste i ljude.

Bolesti prisutne kod divljih svinja predstavljaju poseban problem u zemljama koje pokušavaju da iste iskorene kod domaćih svinja. Za pojedine infektivne bolesti prisutne kod divljih svinja, domaće svinje i ljudi pokazuju izuzetnu prijemčivost usled nedostatka prethodno stečenog imuniteta.

Posle klasične kuge svinja koja je iskorenjena kod domaćih svinja u Evropskoj uniji i afričke kuge koja predstavlja ozbiljnu pretnju, a posebno posle prvog slučaja kod domaćih svinja u zemljama Baltika i Poljskoj u 2014. godini, reproduktivni i respiratorni sindrom svinja (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS), Aujeckijeva bolest (Morbus Aujeszky – MA, Pseudorabies - PRV), parvovirusna (PPV) infekcija, cirkovirusna infekcija (PCV2), influenza svinja i transmisivni gastroenteritis/respiratorna Coronavirusna (TGE/PRCV) infekcija, najvažnije su virusne bolesti domaćih svinja koje pogađaju savremenu proizvodnju. Ove bolesti pored toga što dovode do velikih direktnih i indirektnih šteta, značajno utiču na dobrobit i zdravlje svinja.

PRRS i PPV infekcija su uzročnici reproduktivnih poremećaja. Najčešće manifestacije ovih infekcija su abortusi, neplodnost krmača, mumifikacija fetusa, rađanje slabo vitalne prasadi itd.

PCV2 infekcija, PRRS i influenza su najvažniji uzročnici respiratornih bolesti kod prasadi i svinja u tovu. Transmisivni gastroenteritis uzrokuje visok morbiditet i mortalitet prasadi još od prvog dana rođenja.

Precizni i sistematizovani podaci o stopi infekcije ovim virusima domaćih svinja u Srbiji, izvorima infekcije, prenošenju sa divljih na domaće i u obrnutom smeru, prostorna i vremenska distribucija nisu dostupni. Takođe, epizootiološka situacija kod divljih svinja, osim klasične i afričke kuge svinja i delimično Aujeckijeve bolesti, nije istražena.

Domaće životinje, koje se i dalje u najvećoj meri drže ekstenzivno i na otvorenom, u direktnoj su vezi sa divljim životinjama. Iako se ne zna dovoljno, postoji nekoliko primera o direktnom prenošenju bolesti sa divljih na domaće svinje: klasična kuga svinja u Nemačkoj, afrička kuga svinja na Sardiniji, Aujeckijeva bolest u Francuskoj. Opisani su slučajevi prenošenja virusa Aujeckijeve bolesti sa divljih svinja na goveda gde se pretpostavlja da su hrana i kontaminirani pašnjaci bili izvor infekcije.

Za sprečavanje kontakata između divljih i domaćih životinja primenjuju se biosigurnosne mere, kao što su funkcionalno i teritorijalno razdvajanje, ali je njihova efikasnost u praksi često nedovoljna, uglavnom zbog specifičnosti načina prenošenja bolesti. Ove mere su najdelotvornije za bolesti koje se prenose polnim putem, a najmanje za aerogene infekcije.

Populacija divljih svinja u Evropi je u stalnom porastu. Smatra se da su blage zime i dobar rod žira poslednjih godina, veoma intenzivna poljoprivredna proizvodnja i prihranjivanje razlozi porasta broja divljih svinja. Dostizanje rizične gustine populacije u pojedinim područjima, moglo bi omogućiti nekim bolestima kao što je klasična kuga svinja da opstanu kod divljih svinja u dužem vremenskom periodu što bi predstavljalo posebnu pretnju domaćoj proizvodnji.

Sa povećanjem broja životinja, povećava se i broj efikasnih kontakata između divljih i domaćih svinja koji na indirektan način utiču na izloženost ljudi patogenima iz divljih životinja.

Divlje svinje su sedentarne životinje. Međutim, u ekstremnim uslovima i pod lovnim pritiskom, one mogu prelaziti razdaljine od 250 km. Ipak, ovakvi slučajevi su pojedinačni i retki.

Disperzija divljih svinja je u negativnoj korelaciji sa gustinom, ali je prevelika gustina upravo razlog napuštanja jednog i osvajanja novog staništa.

Većina gazdinstava u Srbiji gaji svinje na tradicionalan način gde je biosigurnost na veoma niskom nivou. Svinje se često drže na otvorenom, u loše ograđenim prostorima koji omogućavaju lak kontakt sa divljim svinjama. Za divlje svinje, ovakva gazdinstva

su izvor hrane, a česti su slučajevi legala iz direktnog ukrštanja divljih i domaćih svinja.

Razmenjivanje zaraznih bolesti zasigurno se dešava između domaćih i divljih životinja, ali se još uvek ne znaju svi mehanizmi i načini prenošenja.

Zbog navedenog, odlučili smo da izvršimo ispitivanja prisustva virusnih bolesti kod divljih svinja u Srbiji kojima bismo dobili osnovne informacije o epizootiološkoj situaciji, njihovoj raširenosti i trendu pojavljivanja u trogodišnjem periodu od 2012. do 2014. godine. Dobijeni rezultati su iskorišćeni za procenu rizika koji divlje svinje predstavljaju za domaće i doprineli razumevanju pojave i održavanja virusnih bolesti kod domaćih svinja.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. O DIVLJIM SVINJAMA

Divlja svinja je sisar is roda *Sus* i familije *Suidae*, jedna od najrasprostranjenih vrsta sisara na svetu. One su krupne životinje, precij današnjih domaćih svinja.

Duga i izražena glava, kratka njuška, zaobljena leđa, duge noge, braon do crna boja krzna su osnovne karakteristike ove vrste, slika 1 [1].



Slika 1: Divlja svinja (*Sus Scrofa*)  
(fotograf: Lewis Thompson <http://www.ltimages.co.uk/> Lokacija: Forest of Dean, Engleska)

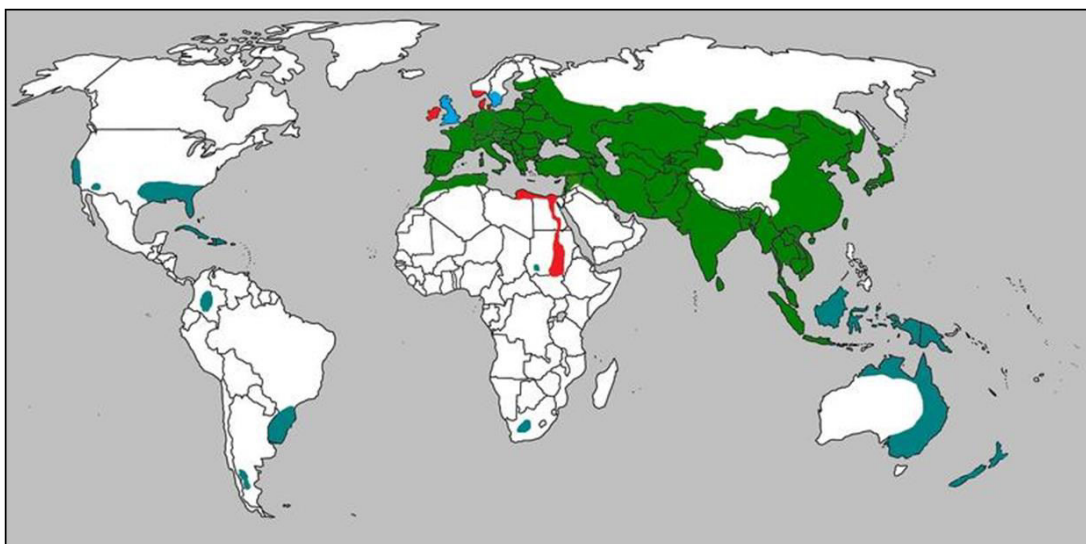
Opisane su 23 podvrste divljih svinja koje se međusobno mogu ukrštati i davati potomstvo. U Evropi, zapadnoevropske divlje svinje su manje od istočnoevropskih kao što su i severnoevropske veće od južnoevropskih. Uobičajeno se zapadnoevropske divlje svinje opisuju kao male, svetlog krzna i sa tamnim čekinjama na ušima, nogama, njušci i repu. Istočnoevropske divlje svinje su veće i uglavnom crnog krzna. Mužjaci i ženke su sličnog izgleda s tim da su mužjaci stariji od 2 godine značajno krupniji od ženki i dobijaju kljove [2].

Pored fenotipskih razlika, zapadno i istočnoevropske divlje svinje se razlikuju i po broju hromozoma. Većina divljih svinja koje žive u Španiji i Francuskoj poseduju 36 hromozoma, a u ostatku Evrope 38, baš kao i domaće svinje [3]. Ukrštanjem životinja sa 36 i 38 hromozoma dobija se plodno potomstvo sa 37 hromozoma [4].

Divlje svinje imaju izuzetno razvijeno čulo sluha i čulo mirisa, dok je čulo vida slabije razvijeno. Veoma su glasne životinje koje groktanjem i rikom međusobno komuniciraju. Kada su uplašene ili uznemirene glasno duvaju kroz nos frkćući, kada su povređene cvile, a kada su zadovoljne tiho grokću.

### 2.1.1. GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST DIVLJIH SVINJA

Divlje svinje su domorodačke vrste Evrope i severne Afrike, slika 2.



- Teritorija koju naseljavaju divlje svinje
- Područja sa kojih su divlje svinje izumrle
- Područja koja su veštačkim putem naseljena nakon izumiranja divljih svinja
- Područja veštački naseljena divljim svinjama

Slika 2: Geografska rasprostranjenost divljih svinja [1]

Naseljavaju teritoriju od mediteranskog basena preko Indije i jugoistočne Azije do Japana, Šri Lanke, Jave, Tajvana, Koreje i Malezije [2]. Ranije su divlje svinje živele u Egiptu, Libanu, na britanskim ostrvima i Skandinaviji, ali su izumrle. Ipak, britanska

ostrva i Skandinavija su svoje teritorije veštačkim putem ponovo naselile divljim svinjama [1]. Pored toga, divlje svinje su veštački naseljene i u druge delove sveta kao što su Amerika, Karibi, subsaharsko područje, Australija, Novi Zeland i Indonezija [1]. Široka rasprostranjenost divljih svinja je rezultat njihove nespecifične ishrane i relativno visoke plodnosti i brojnog potomstva [5].

Broj divljih svinja se konstantno povećava poslednjih decenija pretežno u kontinentalnoj Evropi i Rusiji [6] delom zbog odsustva predatora kao što su mrki medved i vuk, a delom zbog veštačkog prihranjivanja, razvijene poljoprivrede i gajenja kultura koje divlje svinje rado koriste u svojoj ishrani, visoke plodnosti itd. [7].

Gustina populacije divljih svinja u Evropi se procenjuje na ispod 5 životinja na km<sup>2</sup> [8]. Kao vrsta sa najvišom stopom reprodukcije, populacija divljih svinja može da se poveća za 150% tokom samo jedne godine.

### *2.1.2. ISHRANA DIVLJIH SVINJA*

Divlje svinje su oportunistički svaštojedi. Postoji sezonska i regionalna raznolikost u ishrani, zavisno od dostupnih hraniva [9].

Građa digestivnog sistema im omogućava da maksimalno koriste hranjive materije iz hrane. Uz to, poseduju i ogromnu sposobnost čuvanja energije u obliku masnih naslaga što im omogućava da prežive sezone kada nema dovoljno dostupne hrane.

Divlje svinje konzumiraju najviše biljke - do 90%, dok životinjska hrana zauzima 10% u njihovoj ishrani.

Genov [10] je pokazao da u ishrani divljih svinja u Poljskoj biljna hraniva zauzimaju 91%, a animalna 9%. Od biljaka, divlje svinje najviše konzumiraju kultivisane vrste kao što su krompir i kukuruz, a od životinja najviše jedu žabe, miševе i mladunce ptica. Ishrana divljih svinja zavisi i od godišnjeg doba. U južnoj Francuskoj, u ranu jesen najviše jedu sveže voće, semenje i žitarice, a kasnije tokom jeseni i zime korenje i bobičavo voće [11].



Ipak, energetska bogata hrana kao što su žir hrasta ili bukve je omiljena hrana divljih svinja zbog čega su spremne da pređu 100-150 km da bi je pronašle i zadovoljile svoje potrebe za energijom.

### *2.1.3. STANIŠTE I PONAŠANJE DIVLJIH SVINJA*

Zbog izražene prilagodljivosti, divlje svinje nastanjuju različite terene, od polupustinja do tropskih šuma i nadmorskih visina čak do 2400 m. Izbegavaju otvorene prostore i uvek biraju mesta sa dostupnom vodom i zaštitom pod krošnjama drveća [1]. Divlje svinje žive u manjim grupama okupljenim oko dve ili tri reproduktivno sposobne ženke i njihovih mladunaca koji čine centar grupe. Na rubu grupe se nalaze mlade i jedinke iz prošlogodišnjih legala. Veličina grupa je uobičajeno između 6 i 30 divljih svinja.

Zreli mužjaci su u blizini grupe samo tokom sezone parenja. Van sezone parenja oni žive usamljeničkim životom tolerišući druge mužjake, što nije slučaj u sezoni kada se bore za ženke. Različite grupe ženki koegzistiraju na istoj teritoriji, ali čuvaju svoju socijalnu pripadnost.

Struktura grupe se menja sa dolaskom i odlaskom plodnih ženki, migracijom svinja pred polnom zrelošću i dolaskom seksualno aktivnih mužjaka i zrelih ženki koje još nisu imale leglo.

Divlje svinje su noćne životinje. U Nacionalnom parku Marema u Italiji primećeno je da divlje svinje postaju aktivne pre zalaska sunca pa neposredno do islaska sunca, ali aktivnost ne izostaje ni tokom dana [12].

Većinu vremena divlje svinje provode u potrazi za hranom. Pored toga, kaljužanje je radnja koju redovno koriste za rashlađivanje i uklanjanje parazita. Svoju teritoriju obeležavaju ostavljajući miris na stablima drveća trljajući se o njih kao i u barama za kaljužanje [1].

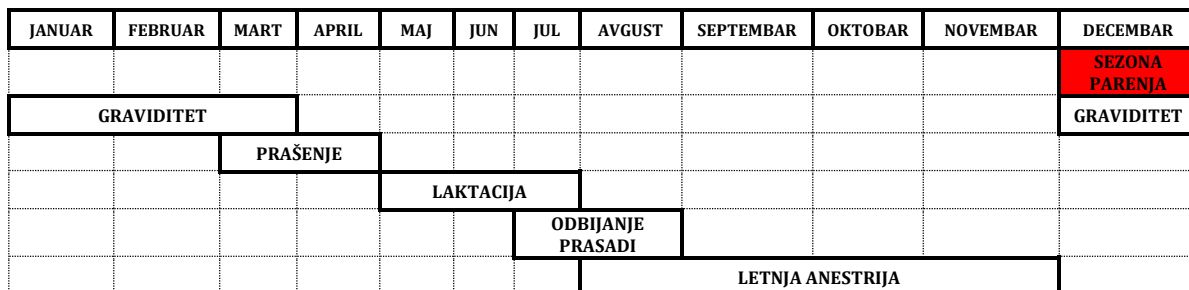
Divlje svinje ispoljavaju agresivno, antipredatorsko ponašanje. Sposobne su da ubiju svoje predatore kljovama, a takođe napadaju i u grupama. Agresivnost je izraženija kada divlje svinje štite mladunce [1].

#### 2.1.4. RAZMNOŽAVANJE DIVLJIH SVINJA

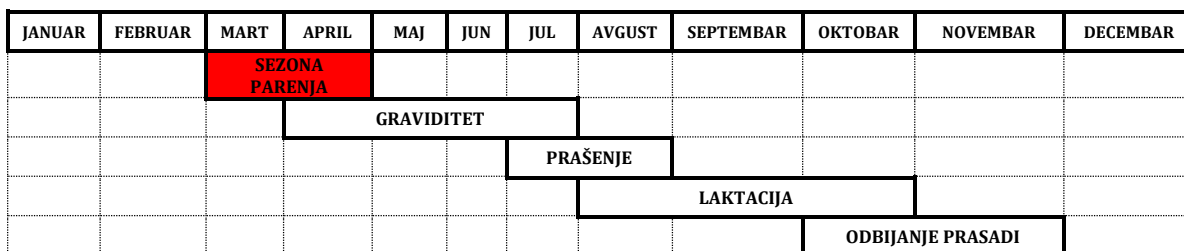
Divlje svinje su sezonski poliestrične životinje. Kod evropskih divljih svinja okidač za početak sezone parenja i proizvodnju testosterona je kratka obdanica. Tokom trajanja sezone parenja i najveće produkcije testosterona, jedan divlji nerast je odbijao da jede 6 sedmica i izgubio 25% težine [13]. Dominantan mužjak je otac najvećem broju mladunaca. Mužjaci mogu da se pare sa ženkama preko cele godine, ali im je aktivnost ipak najniža kada su obdanice najduže. Tokom sezone parenja, mužjaci se priključuju grupi ženki, međusobno se tuku za dominaciju, a mladi mužjaci iz poslednjeg legla bivaju oterani iz grupe.

Divlje krmače imaju ciklus koji traje 21 dan, od jeseni do juna/jula kada postaju anestrične sve do naredne jeseni. Anestrija nastaje kao posledica laktacije ili, ređe, zbog novog graviditeta. Početak jesenjeg estrusa uslovljen je lako dostupnom hranom, kratkom obdanicom i endokrinim mehanizmima [3].

Graviditet krmače traje 115-120 dana, a u Evropi se prasad rađaju najčešće između februara i maja. Dok drugi papkari rađaju mladunce u relativno kratkom vremenskom razdoblju, divlje krmače se prase u periodu od 6 meseci (slike 3 i 4).



Slika 3: Životni ciklus odrasle krmače



Slika 4: Životni ciklus nazimice

Krmače se prase u brlozima sa pogledom na otvoreni prostor. Legla su obično veličine 4-6 prasadi. Broj prasadi u leglu je u direktnoj vezi sa geografskom širinom [14]. Uočen je porast broja prasadi za 0,15 prasadi po stepenu geografske širine odnosno jedno prase na 6,6 stepeni geografske širine. Jedno od obrazloženja za ovakvu pojavu je ishrana divljih svinja koja je zimi na većim geografskim širinama siromašna što nepovoljno utiče na reprodukciju [14].

Boitani i sar. [6] su uočili da veličina legla zavisi od težine krmače, ali ne i od starosti. Ishrana krmače je od presudnog značaja za plodnost. U odsustvu hrastovog i bukvinog žira nisu retki reproduktivni poremećaj koji traju sve dok ne stigne širokolisna trava.

Mladunci se rađaju sa prugastim krznom koje postaje homogena boje sa 5 meseci starosti. Rijanje je radnja koju vrlo brzo savladaju dok se termoregulacija uspostavlja tek sa 1 mesecom starosti. Prasad napuštaju brlog i prate majku od 2. sedmice starosti. U 4. i 5. sedmici ćerka krmača iz prethodnog legla dovodi svoje mladunce i od tada deli brlog sa majkom i njenim novim leglom.

Krmače u potpunosti odbijaju prasad sa 3-4 meseca starosti.

U pubertet ulaze sa 8-24 meseca, u zavisnosti od spoljašnjih faktora. Razlika u težini između mužjaka i ženki postaje uočljiva sa 18 meseci kada ženke prestaju da dobijaju na težini i zadržavaju se na 50 kg, a mužjaci nastavljaju da se goje, sve do 90 kg u kasnijim godinama. Divlje svinje mogu živeti do 12 godina [15], a gde se love prosečan životni vek je 23 meseca. Najveći mortalitet kod divljih svinja je u toku prve dve godine života, a najkritičniji period za preživljavanje su prva 3 meseca života i jesenji period.

#### *2.1.5. TERITORIJALNOST I RASELJAVANJE DIVLJIH SVINJA*

Veličina teritorije divljih svinja zavisi od dostupnosti hrane, vode i skrovitih mesta. Boitani i sar. [12] su utvrdili da se površina teritorije divljih svinja u Italiji kreće od 1,1 do 3,9 km<sup>2</sup> u šumovitim krajevima. Divlje svinje imaju mala skrovita mesta u koja se uvek vraćaju nakon obroka ili nakon noćnog traženja hrane. Teritorije različitih grupa se preklapaju, naročito zimi, ali skrovita mesta za odmor nikada. Teritorija mužjaka se može preklapati sa teritorijom za odmor ženki ukazujući da su mužjaci

najzainteresovaniji za teritoriju na kojoj borave ženke [12]. Teritorija ženki je skrovitija od teritorije mužjaka.

Spitz i Janeau [16] su, posmatrajući divlje svinje u južnoj Francuskoj, opisali dve vrste njihovog kretanja. Kretanje sporije od 1 km/h koje odgovara hranjenju, kaljužanju, istraživanju, obeležavanju teritorije i kretanje brže od 2 km/h pri bežanju, ili kada nerast ili krmača sa prasadima napušta teritoriju na kojoj se hrane i idu ka teritoriji za odmor. Brzina kretanja divljih svinja se povećava sa porastom spoljašnje temperature. Takođe, padavine utiču na kretanje, ubrzavajući ga tokom toplih meseci i usporavajući preko zime.

Divlje svinje primenjuju strategiju raseljavanja čak i pre nestanka hrane sa jednog lokaliteta. Interesantno je da ovu strategiju uobičajeno primenjuju mali sisari, a ne divlji papkari [17].

Divlje svinje se raseljavaju kada su u fizički dobroj kondiciji i kada je mortalitet posledično nizak [17]. Raseljavaju se individualno ili u grupi, a najčešće se sele odrasli mužjaci ili mužjaci i ženke dvogodišnjaci.

Preseljavanja se najčešće vrše korišćenjem prirodnih puteva.

Divlje svinje su dobri plivači; zabeleženo je da je jedna svinja preplivala reku široku 700 m [18]. Isti autori su zabeležili da je jedna divlja svinja u Poljskoj prešla čak 250 km u potrazi za novim, odgovarajućim staništem.

## 2.2.VIRUSNE BOLESTI DIVLJIH SVINJA ENZOOTSKOG POTENCIJALA

Divlje svinje obolevaju od istih zaraznih bolesti kao i domaće svinje: mnoge virusne bolesti domaćih prisutne su i kod divljih svinja koje su ujedno i rezervoari infekcije. Najvažnije među njima su klasična i afrička kuga svinja.

Klasična kuga svinja je virusna bolest koja se veoma dugo, u malim žarištima, može održavati u divljim svinjama preteći da se prenese na domaće svinje [19].

Afrička kuga svinja je relativno nova bolest na evroazijskom kontinentu jer je poslednji put iz Afrike prenet u Gruziju 2007. godine odakle se veoma brzo raširila u zemljama Kavkaza, Rusije, Belorusije i Ukrajine. U 2014. godini otkriveni su i prvi slučajevi afričke kuge u Evropskoj uniji kod divljih svinja, prvo u Litvaniji, a zatim u Poljskoj, Letoniji i Estoniji. Utvrđeno je da se afrička kuga svinja kod divljih svinja širi lokalno i nezavisno od izbijanja kod domaćih svinja. Takođe, nije utvrđena ni zavisnost između gustine populacije divljih svinja i izbijanja bolesti. Ipak, svi slučajevi kod domaćih svinja su zabeleženi u krajevima pogodnim za život divljih svinja [20].

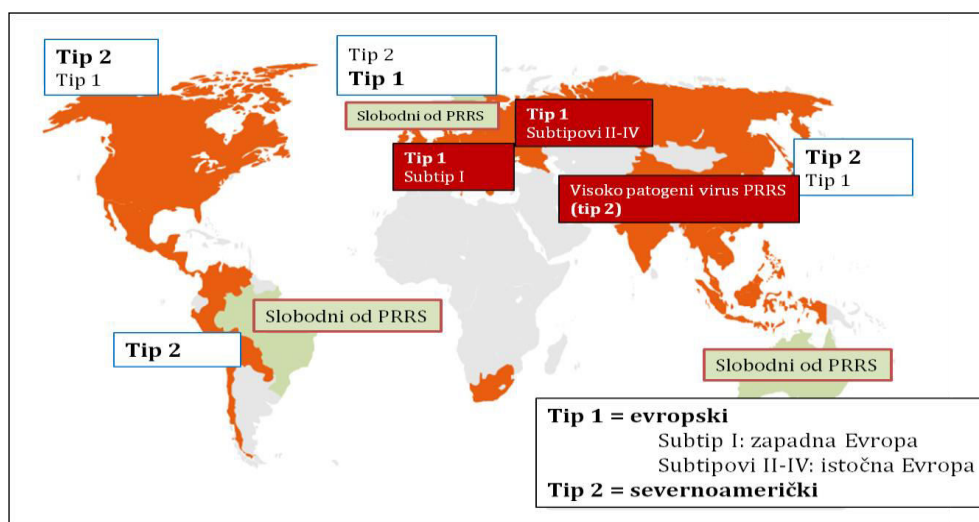
Poznato je da bolesti utiču na populacionu dinamiku divljih životinja, ali efekti većine virusnih bolesti, uključujući i one sa enzootskim potencijalom kao što su PRRS, Aujeckijeva bolest, PPV i PCV2 infekcija, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija, na evropsku divlju svinju nisu poznati.

### 2.2.1. REPRODUKTIVNI I RESPIRATORNI SINDROM SVINJA (PRRS)

Reproduktivni i respiratorni sindrom svinja je veoma zarazno virusno oboljenje svinja koje se manifestuje reproduktivnim poremećajima kod krmača i respiratornim poremećajima kod prasadi.

#### 2.2.1.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST

PRRS je prvi put otkriven u Severnoj Americi 1987. godine, a zatim 1989. u Japanu i 1990. u Nemačkoj, da bi danas jedino Australija, Novi Zeland, Finska, Norveška, Švedska, Švajcarska i neke južnoameričke zemlje ostale zemlje slobodne od ove bolesti, slika 5 [21]. Otkada je otkrivena, bolest je postala enzooska na globalnom nivou sa sporadičnim pojavljivanjem u formi teške kliničke slike sa visokim morbiditetom i mortalitetom. Postoje dokazi da se PRRS pojavljivao i pre 1987. u Severnoj Americi i pre 1990. u Evropi. U arhivskim uzorcima krvnih seruma iz istočne Nemačke iz 1988. godine dokazana su antitela protiv virusa PRRS-a [22].



Slika 5: Rasprostranjenost PRRS-a u svetu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Preuzeto sa <http://www.prrscontrol.com>

### **2.2.1.2 ETIOLOGIJA**

Virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRSV) je uzročnik istoimenog oboljenja svinja. Ovaj virus je prvi put izolovan u Evropi 1991. godine, u Holandiji, kada je nazvan „Lelistaad virus“, a zatim 1992. u SAD-u [21]. Virus PRRS-a je klasifikovan u red *Nidovirales* i familiju *Arteriviridae*, zajedno sa virusom virusnog arteritisa konja (EVA), laktat dehidrogenaza virusom miševa (LDV) i virusom hemoragične groznice majmuna (SHFV) [23]. Smatra se da je virus PRRS-a upravo nastao u centralnoj Evropi, u divljim svinjama koje su se hranile miševima obolelim od LDV [24]. Kao i ostali članovi ove familije, virus poseduje jednolančanu RNK pozitivnog polariteta, veličine oko 15 kb koja sadrži najmanje 10 otvorenih okvira čitanja (ORF) [23].

ORF1a i ORF1b se nalaze na 5` kraju RNK i kodiraju replikazu koja se autoproteolitičkim putem cepa u 13 manjih nestrukturnih proteina uključujući i RNK polimerazu. ORF2a, ORF2b i ORF3-7 kodiraju strukturne proteine GP2a, 2b, GP3, GP4, M i N protein. GP5 protein koji kodira ORF5 je osnovni protein omotača, odgovoran za ulazak virusa u ćelije.

Zbog izrazitih genetskih razlika (60% homologije), virusi PRRS-a su podeljeni u dva tipa – tip 1 u koji su smešteni virusi izolovani u Evropi i tip 2 gde se nalaze severnoamerički virusi PRRS-a [25]. Ovakvu podelu donedavno je pratila i geografska distribucija, međutim, poslednjih godina u Evropi, pored tipa 1, u Poljskoj, Danskoj, Nemačkoj i Mađarskoj otkriveni su i virusi izolovani u Severnoj Americi.

### **2.2.1.3 EPIZOOTIJSKI PROCES**

Virus PRRS-a je ekskluzivan virus domaćih i divljih svinja i nije dokazan kod drugih vrsta. Kod domaćih svinja se širi veoma brzo tako da čitava farma bude zaražena u roku od 2 do 3 meseca tokom kojih 85-90% životinja postane seropozitivno. Gustina populacije na farmi i samih farmi međusobno utiče na brzinu širenja virusa [26].

Većina zapata domaćih svinja je enzooski zaražena. Samo mali broj zapata se nalazi u prolaznoj, akutnoj fazi infekcije koje se ponavljaju svakih 2-4 meseca nakon čega sledi povratak na redovno stanje (enzooska faza).

Seroprevalencija na nivou zapata varira i zavisi od brojnih faktora kao što su tip farme, gustina svinja na farmi, veličina zapata itd. Neki autori su pokazali da se serokonverzija najčešće dešava kod prasadi stare 8-14 nedelja, da bi do kraja tova 80-100% svinja bilo serološki pozitivno, ali uz različit procenat viremičnih životinja. Smatra se da je u područjima koja su gusto naseljena svinjama u SAD-u, 60-80% zapata zaraženo virusom PRRS-a [27].

Svinje se mogu zaraziti ovim virusom na više načina – oralnim, intranazalnim, intramuskularnim, intraperitonealnim i vaginalnim putem. Virus se primarno replikuje u makrofagima posle čega sledi perzistentna viremija. Uprkos intenzivnoj replikaciji u respiratornom traktu, prenošenje aerosolom se ne smatra primarnim, već se u većini slučajeva virus prenosi u direktnom kontaktu među svinjama [26]. Kako se virus može izlučivati spermom bez viremije, a uz prisutna neutralizaciona antitela, evidentno je da se replikacija odigrava i u drugim tkivima osim tkiva respiratornog trakta. Trajanje viremije je identično kod nerastova i krmača, ali svakako kraće nego kod mladih životinja. Razlog ove pojave je zreo imuni sistem odraslih životinja koji omogućava uklanjanje virusa iz organizma za kraće vreme. Humoralni imunološki odgovor nastaje nedelju dana od infekcije sa maksimalnim titrom antitela oko 30. dana od inficiranja [28].

Virus se izlučuje pljuvačkom, nosnim iscetkom, urinom, fecesom, mlekom i spermom. Danas se zna da je primaran problem za kontrolu PRRS-a veoma lako prenošenje virusa čak i na globalnom nivou. Period izlučivanja može biti veoma dug [29]. Pokazano je da se virus može izlučivati čak 157 dana nakon infekcije [30].

#### **2.2.1.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

Kod gravidnih krmača, period gestacije u kojem je infekcija nastala ima presudan uticaj na sam ishod infekcije. S obzirom na to da virus do 72. dana gestacije ne prolazi transplacentarnu barijeru, infekcije koje nastaju kasnije dovode do intrauterine infekcije fetusa i do abortusa. Mumificirani plodovi, prevremeno ili zakasnelo prašenje, istovremeno prašenje mrtve i žive, najčešće slabo vitalne prasadi i mrtvorodenja se pripisuju infekciji virusom PRRS-a [31].



Kod nerastova su najčešći simptomi anoreksija, letargija i smanjen libido, mada su zabeleženi i slučajevi poremećaja kvaliteta sperme, pokretljivosti spermatozoida i smanjen broj spermatozoida sa normanim akrozomom [32].

Kod prasadi, ključne manifestacije infekcije virusom PRRS-a su respiratorni poremećaji u kojima dominira intersticijalna pneumonija. Krajnji ishod zavisi uglavnom od komplikovanja sekundarnim infekcijama i virulencije samog virusa koju pojačava dejstvo stresa. Infekcija prasadi se najčešće događa kada iz cirkulacije nestanu zaštitna maternalna antitela. Pneumonija nastaje za 3 do 28 dana od infekcije, a najteža klinička slika se viđa oko 10. dana. Zapaljenje može zahvatiti cela pluća, ali su lezije češće lokalizovane u donjim partijama. Većina limfnih čvorova je 2-10 puta povećana.

Makroskopske lezije variraju u zavisnosti od starosti i drugih oboljenja, ali dominira limfadenopatija. Histološki, karakterističan nalaz je slaba do teška intersticijalna pneumonija i hiperplazija limfatičnih folikula sa ćelijskom nekrozom. Ostale lezije koje mogu biti uočene su rinitis, encefalitis i miokarditis [26].

#### **2.2.1.5 DIJAGNOZA**

Dijagnoza PRRS-a se postavlja na osnovu kliničkih simptoma i rezultata laboratorijskih analiza.

Laboratorijska dijagnostika se zasniva na dokazivanju virusa izolacijom na kulturi tkiva, dokazivanjem virusnih antigena imunofluorescencijom ili imunohistohemijski, dokazivanjem genoma ili specifičnih antitela [31].

#### **2.2.1.6 TERAPIJA I KONTROLA**

Prevenција PRRS-a na farmama domaćih svinja podrazumeva striktnu primenu biosigurnosnih mera. Ukoliko se PRRS pojavi na farmi, može se kontrolisati metodom „testiraj i ukloni“, uništavanjem čitavog zapata ili vakcinacijom [26].

### **2.2.1.7 PRRS KOD DIVLJIH SVINJA**

Virus PRRS-a je dokazan kod divljih svinja u Nemačkoj, Italiji i Francuskoj dok ispitivanja u Hrvatskoj, Rusiji, Sloveniji, Švedskoj i istočnoevropskim zemljama nisu potvrdila njegovo prisustvo [33]. Iako je PRRS veoma prisutan kod domaćih svinja, čak i nalaz specifičnih antitela kod divljih je sporadičan: u Španiji je dokazana niska seroprevalencija kod divljih svinja [26] kao i u Francuskoj (1,3%) [34] dok je u Hrvatskoj i Italiji utvrđena u višem procentu, 8,9% i 37,8% [35, 36].

Kod divljih svinja, seroprevalencija je nešto viša kod mladih (6,4%) nego kod odraslih (4%) životinja, ali je značajna razlika u seroprevalenciji utvrđena kod različitih metapopulacija sugerirajući da su lokalni uslovi sredine ključni u širenju PRRS-a kod divljih svinja [26].

Vreme preživljavanja virusa PRRS-a u aerosolu zavisi od temperature i relativne vlažnosti vazduha: za duže preživljavanje potrebne su niske temperature i niska vlažnost vazduha što takođe objašnjava uticaj spoljašnjih faktora na brzinu širenja infekcije u prirodnim uslovima [26].

Trenutno se smatra da je divlja svinja pravi domaćin na koga se virus prenosi sa domaćih svinja u kojima se virus održava. Ipak, virus PRRS-a se može održavati i u gustim populacijama divljih svinja koje imaju visoku stopu infekcije [26]. Malo se zna o putevima širenja među divljim svinjama, grupama i populacijama divljih svinja kao i između domaćih i divljih svinja [26].

Različite studije su pokazale da je širenje virusa PRRS-a sa domaćih svinja na divlje verovatnije nego u obrnutom smeru i da se ovaj proces uglavnom dešava u područjima sa gustom populacijom domaćih svinja [37].

Divlje svinje se smatraju rezervoarima mnogih bolesti koje se mogu preneti na domaće svinje, ali ne i virusa PRRS-a [38].

Putevi izlučivanja virusa kod divljih svinja nisu u potpunosti poznati, ali zbog visokog titra virusa u plućima, smatra se da širenje aerosolom ili aerogeno širenje ima najveći značaj [26]. Takođe, klinički slučajevi PRRS-a kod divljih svinja nisu opisani.

Perzistentne infekcije koje su kod domaćih svinja karakteristika ovog oboljenja, nisu dokazane i kod divljih svinja.

PRRS je uzrok povraćanja, kasnih abortusa, mrtvorodenja, rađanja slabovitalne prasadi. Teški respiratorni poremećaji kod prasadi na sisi i odlučene prasadi su karakteristika PRRS-a kod ovih kategorija svinja. Ni jedan od ovih simptoma nije opisan kod divljih svinja.

Lezije kod divljih svinja koje se mogu povezati sa PRRS-om nisu opisane.

Kontrola ove bolesti se kod divljih svinja ne sprovodi, iako ima dokaza da je kod njih prisutna [26].

### *2.2.2. AUJECKIJEVA BOLEST – MORBUS AUJESZKY*

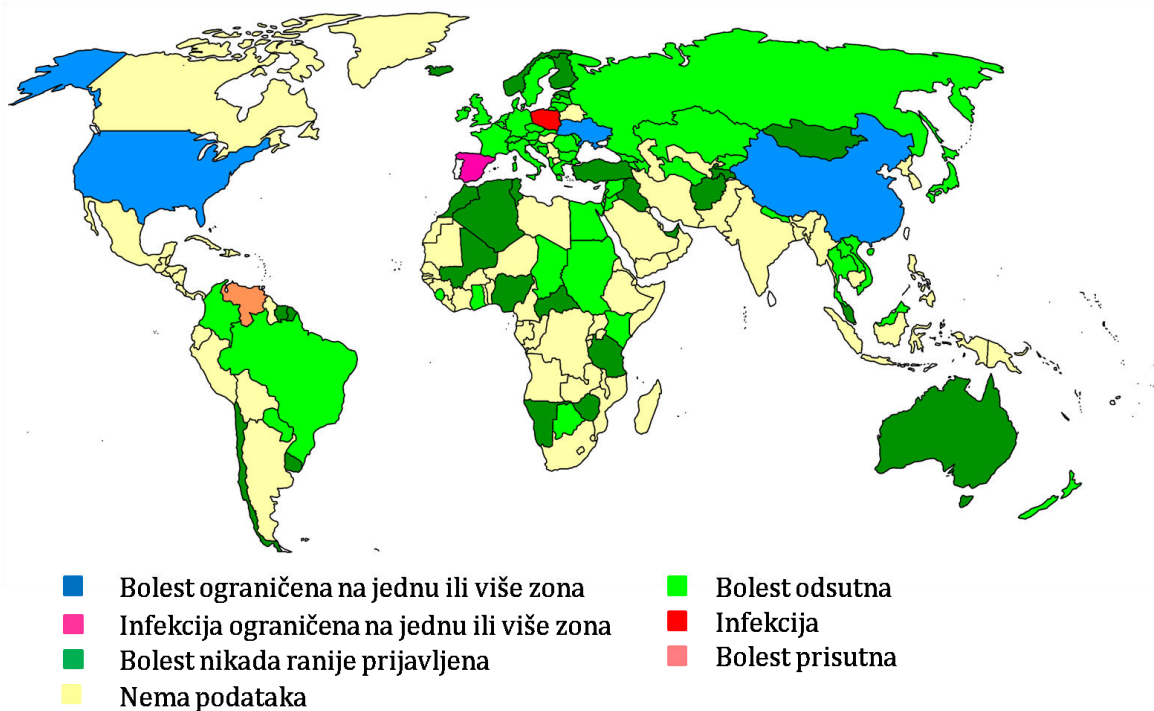
Aujeckijeva bolest (Morbus Aujeszky - MA) ili lažno besnilo (Pseudorabies - PRV) je veoma zarazna i ekonomski veoma značajna bolest svinja koja pogađa centralni nervni sistem mladih životinja, uzrokujući visok mortalitet, i respiratorni sistem starijih svinja. Bolest je fatalna za mnoge druge vrste koje dođu u kontakt sa zaraženim svinjama.

#### **2.2.2.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST**

Aujeckijeva bolest je veoma raširena, slika 6 [39]. Dokazana je u Evropi, jugoistočnoj Aziji, Centralnoj i Južnoj Americi uključujući Meksiko, na Kubi, u Samoi, Ruandi. Ipak, zbog izuzetnog ekonomskog značaja, u mnogim razvijenim zemljama je iskorenjena (Belgija, Češka, Danska, Nemačka, Irska, Kipar, Luksemburg, Holandija, Austrija, Slovenija, Slovačka, Finska, Švedska, Velika Britanija, Kanada, Novi Zeland) ili je u procesu iskorenjivanja<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Official Journal of the European Union: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008D0185&from=EN> (accessed March 2015)



Slika 6: Geografska rasprostranjenost Aujeckijeve bolesti [40]

#### 2.2.2.2 ETIOLOGIJA

Uzročnik Aujeckijeve bolesti je Suid Herpesvirus 1 (SHV1), takođe poznat i kao Pseudorabies virus (PRV) [40]. Pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Karakteristike ove familije su širok spektar domaćina, uspostavljanje latentnog stanja u senzornim neuronima i relativno kratko vreme replikacije. Virus poseduje dvolančanu DNK veličine 143461 nukleotida sa više od 70 otvorenih okvira čitanja. Sferičnog je oblika, veličine 120-200 nm u prečniku [41].

Postoji samo jedan serotip PRV-a, dok se restrikcionom analizom sa BamHI enzimom mogu utvrditi 4 genotipa. Za genotipizaciju se danas koristi i parcijalna sekvenca ul44 gena. Ul44 gen kodira glikoprotein C koji je potentan stimulator imunološkog sistema i preko kojeg se vrši adhezija virusa na ćelijsku membranu. Filogenetskom analizom ul44 gena razlikuje se 5 genotipova PRV-a [42]. Us8 gen se takođe može koristiti za filogenetsku analizu ovog virusa. Ovaj gen kodira gE koji nije ključan za proces

replikacije, ali se njegovom delecijom virus slabi i kao takav koristi u proizvodnji atenuiranih vakcina [43].

Na osnovu nukleotidne sekvence gena za glikoprotein C, PRV izolovani iz divljih svinja iz nekoliko evropskih zemalja grupišu se u genotip I u kojem se nadalje diferenciraju u grupe A i B [42].

### **2.2.2.3 EPIZOOTIJSKI PROCES**

Divlje svinje su prirodni domaćini, ali mnoge druge vrste, kao što su mesojedi, glodari i papkari su prijemčivije za ovaj virus i imaju ulogu sekundarnog domaćina. U njima se PRV infekcija razvija u smrtonosno oboljenje koje se manifestuje neurološkim disfunkcijama zbog čega se Aujeckijeva bolest često naziva i lažno besnilo - simptomi podsećaju na besnilo. Evropska divlja svinja smatra se rezervoarom virusa Aujeckijeve bolesti [44].

Za širenje Aujeckijeve bolesti u prirodnim uslovima je neophodan blizak kontakt među svinjama kao što su koitus, lizanje, njuškanje. Aujeckijeva bolest se smatra visoko kontagioznom i po praviliu se širi respiratornim putem. Širenje u jednom zapatu se dešava veoma brzo, ali je vreme širenja između zapata značajno duže. Oralni i nosni sekreti su najvažniji izvor infekcije. Virus se u zapat unosi najčešće uvođenjem zaražene životinje, pri čemu poseban značaj imaju svinje koje ne pokazuju kliničke simptome već se nalaze u latentnom stadijumu bolesti. Ostali putevi širenja su preko semena, kolostruma, mleka, kontaminirane opreme. Pošto virus preživljava do 5 sedmica u mesu, ishrana pomijama ima određenu ulogu u širenju infekcije. Ipak, za nastanak infekcije preko digestivnog trakta, potrebna je veća doza virusa [31].

Virus može ostati infektivan nedeljama u anaerobnim uslovima, na travi, u fecesu, slami što je od epizootiološkog značaja za održavanje virusa među divljim svinjama.

Infekcija PRV-om nastaje preko ćelija sluzokože orofarinksa, digestivnog, respiratornog ili genitalnog trakta odakle aksonskim transportom perifernih neurona odlazi do centralnog nervnog sistema. Ukoliko svinje prežive akutni tok bolesti, infekcija prelazi u latentnu, a virus se povlači u neurone [45]. Mesto gde se virus nalazi tokom trajanja latentne faze se razlikuje kod domaćih i divljih svinja: trigeminalne

ganglije kod domaćih, a sakralne kod divljih svinja. Tokom trajanja latentnog stanja, odigrava se transkripcija koja je ograničena na samo nekoliko gena, što je najverovatnije primarno za efikasnu reaktivaciju virusa. Ovi transkripti nose gene za sintezu proteina koji omogućavaju opstanak zaraženog neurona i ravnotežu između latentnog stanja i reaktivacije. Detekcija DNK virusa u tonzilama moguća je veoma dugo nakon nastanka infekcije i ukazuje na potencijalno latentno stanje koje se održava i u drugim tkivima, osim u nervima [45].

Smatra se da je stres okidač za reaktivaciju virusa. Vreme od dejstva stresogenog faktora (u veštačkim uslovima davanje kortikosteroida) do izolacije virusa iz nosnog sekreta može biti od 1 do 11 dana, a moguće i duže. Pretpostavlja se da su faktori koji utiču na vreme do reaktivacije virusa starost, rasa i zdravstveno stanje životinja, ali i virulentnost virusa, inicijalna doza koja je dovela do latentnog stanja, intenzitet stresa i vreme koje protekne od akutne infekcije do moguće reaktivacije [31].

#### **2.2.2.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

Klinički simptomi zavise od virulencije i doze unetog virusa, starosti životinje i njenog imunološkog i reproduktivnog statusa [46]. Najčešće se manifestuju kod prasadi i krmača.

Prasad mlađa od 2 sedmice uginu za nekoliko sati od nastanka infekcije. Kod starijih od 2 sedmice se razvija groznica, gubitak apetita, depresija, povraćanje, respiratorni simptomi, nervni simptomi-nekoordinisano kretanje, podrhtavanje mišića, konvulzije, nevoljno pomeranje očnih jabučica, paraliza. Mortalitet kod ove kategorije prasadi iznosi 20-100%. Kod odbijene prasadi dominiraju respiratorni simptomi (kašalj, otežano disanje, konjunktivitis), a mortalitet iznosi 5-10% [46].

Odrasle svinje obolevaju od blage respiratorne forme koja se može širiti veoma brzo, ali uz mortalitet 1-2%. Gravidne krmače, zbog posledica infekcije, najčešće pobace ili rode mrtvu prasad, mumificirane plodove ili živu prasad koja uginu u roku od 1 do 2 dana [46].

Patomorfološke promene su često minimalne ili potpuno odsutne. Mogu se uočiti purulentna inflamacija nosa, ždrela i tonzila, kongestija i konsolidacija pluća,

kongestija moždanih ovojnica, limfnih čvorova, mala bela do žuta nekrotična polja u slezini i jetri pobačenih plodova, kao i nekrotični placentitis [31].

#### **2.2.2.5 DIJAGNOZA**

Dijagnoza Aujeckijeve bolesti se postavlja primenom izolacije virusa, molekularnih i seroloških testova. Virus se može izolovati na ćelijskoj kulturi gde stvara karakterističan citopatogeni efekat (CPE) [31]. Za dokazivanje genoma, geni koji kodiraju gB i gD se najčešće koriste zbog konzerviranosti.

Antitela protiv virusa se mogu dokazati virus neutralizacionim testom (VNT) ili ELISA [31].

#### **2.2.2.6 TERAPIJA I KONTROLA**

Bolest se može kontrolisati vakcinacijom. Danas postoje marker vakcine kojima se može razlikovati vakcinalni od infektivnog imuniteta [47].

Vakcinisane svinje su otpornije na veće doze virusa od nevakcinisanih čime se sprečava klinički oblik bolesti. Ukoliko se zaraze, kod vakcinisanih svinja virus ne prolazi transplacentarnu barijeru i izlučuje se u manjoj meri tokom kraćeg vremenskog perioda. Ipak, virus i kod vakcinisanih svinja prelazi u latentno stanje iz kojeg se može reaktivirati, a zatim i izlučivati [47].

Vakcinacijom se utiče na epizootiološki proces tako što se smanjuje količina virusa u vazduhu i na predmetima i time usporava širenje bolesti u i među zapatima [47].

Upotrebom vakcinacije otkrivanje zaraženih zapata je otežano, a serološki testovi gube značaj. Vakcinacijom svinja marker vakcinom i upotrebom pratećih dijagnostičkih testova, ova organičenja se mogu prevazići.

#### **2.2.2.7 AUJECKIJEVA BOLEST KOD DIVLJIH SVINJA**

Iako je klinička forma Aujeckijeve bolesti retko viđena kod divljih svinja, seroprevalencija u Evropi se kreće od 0 do više od 50%: u Španiji 0,8-44% [48, 49], Francuskoj 3,5% [34], Italiji 30-51% [35, 50], Švajcarskoj 2,8% [51], Hrvatskoj 55% [52], Sloveniji 31% [53], Poljskoj 11% [54] i Rusiji 32% [55]. Suprotno njima, u

zemljama sa malim brojem divljih svinja kao što su Holandija i Švedska u kojima broj divljih svinja odnedavno raste, serokonverzija nije dokazana [56, 57].

Generalno se smatra da se sa starošću povećava šansa divljih svinja da dođu u kontakt sa virusom, kao i da su ženke zbog većeg broja ostvarenih kontakata pod većim rizikom od obolevanja. Glavni putevi prenošenja kod divljih svinja u Evropi nisu poznati; pretpostavlja se da je oronazani put uobičajen način nastanka infekcije. Američki istraživači su dokazali da se bolest načešće prenosi koitusom. Smatra se da je oronazalni put dominantniji kod ženki koje žive u grupama, a kod mužjaka polni. Mlade divlje svinje starosti 4-8 meseci su kategorija divljih svinja koja najčešće oboleva od Aujeckijeve bolesti, uz mortalitet od 14% [58]. Povećani limfni čvorovi, kongestija tonzila, petehijalna krvarenja u crevima, injicirani krvni sudovi u mozgu i moždanim ovojnicama su najprisutnije patomorfološke promene kod divljih svinja [58].

Iako nema dokaza da su divlje i domaće svinje različite prijemčivosti, pokazano je da se izolovani virusi od divljih svinja razlikuju od virusa izolovanih iz domaćih, ali da imaju isto poreklo [39, 59].

### *2.2.3. PARVOVIRUSNA (PPV) INFEKCIJA SVINJA*

Parvovirusna infekcija svinja se smatra najčešćim uzrokom reproduktivnih poremećaja kod svinja koji se manifestuju povlađanjem, abortusima, mumifikacijom plodova, rađanjem kržljave prasadi. Ovi simptomi se nazivaju jednim imenom SMEDI (stillbirth, mummification, embryonic death and infertility) [60]. Karakteristično za parvovirozu je da se infekcija seronegativnih, gravidnih krmača završava transplacentarnom infekcijom fetusa. Ukoliko se infekcija fetusa dogodi pre dostizanja imunološke kompetencije, dolazi do uginuća fetusa, mumifikacije, rađanja mrtve prasadi. Infekcija kod negravidnih krmača prolazi bez kliničkih simptoma, uz brzo stvaranje doživotnog imuniteta [61].



### 2.2.3.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST

PPV infekcija je enzootska bolest u većini zemalja u kojima se gaje svinje. Od ove bolesti obolevaju sve kategorije svinja, uključujući nerastove i tovljenike [62].

### 2.2.3.2 ETIOLOGIJA

Svi parvovirusi pripadaju porodici *Parvoviridae* u kojoj se razlikuju dve podfamilije: *Densovirinae* - virusi insekata i *Parvovirinae* - virusi kičmenjaka [63].

U podfamiliji *Parvovirinae* se nalazi 5 rodova: *Dependovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus*, *Bocavirus* i *Parvovirus*. Rodu *Parvovirus* pripada i parvovirus svinja [63]. Parvovirusi su jednolančani DNK virusi bez omotača, veličine 5-6 kb. Na genomu se razlikuju dva ORF-a, jedan za kodiranje nestrukturnih i drugi za kodiranje strukturalnih proteina [63].

ORF1 se nalazi na 5' kraju genoma i kodira nestrukturalni protein 1 (NS1) od kojeg cepanjem nastaju NS2 i NS3 nestrukturalni proteini. NS1 ima funkciju helikaze i nikaze koje učestvuju u procesu replikacije i formiranja zrele virusne partikule. Funkcije NS2 i NS3 nisu u potpunosti poznate. Na 3' kraju nalaze se geni koji kodiraju strukturalne proteine VP1 i VP2 [64].

Poređenjem sekvenci avirulentnog NADL2 soja i virulentnog Kresse soja nisu uočene razlike u genima za nestrukturalne proteine, već samo za strukturalne i to na 8 mesta, od kojih 6 dovode do zamene aminokiselina. Uprkos uočenim zamenama aminokiselina, smatra se da PPV ima nisku stopu mutacija [65].

Upoređivanjem virusnih antigena, utvrđena je izrazita sličnost izolovanih sojeva virusa, odnosno samo jedan serotip [61].

Poslednjih godina, upotrebom savremene molekularne metodologije, otkriven je veliki broj novih parvovirusa koji uglavnom pripadaju podfamiliji *Parvovirinae*: PARV4 – humani Parvovirus, PPV3 – *Porcine Hokovirus*, *Ovine Partetravirus*, PPV4 i PPV5. PPV3 i *Ovine partetravirus* su veoma bliski humanom PARV4 te se odvajaju kao poseban *Tetraparvovirus* rod. PPV4 i PPV5 su izolovani iz kliničkih uzoraka poreklom od svinja, ali formiraju odvojenu granu sa bovinim parvovirusom 2 (BPV2) i predstavljaju zaseban *Copiparvocirus* rod. Parvovirusi koji su izolovani kod svinja dele se u 6

filogenetskih grupa PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5 i Bocavirus svinja (PBoV). Parvovirus 1 (PPV1) je najrašireniji kod svinja. PPV2 je otkriven slučajno tokom istraživanja hepatitisa E, a PPV4 je opisan u Severnoj Karolini u arhivskim uzorcima iz 2005. godine [66].

### **2.2.3.3 EPIZOOTIJSKI PROCES**

PPV je ubikvitaran virus koji se u spoljašnju sredinu izlučuje preko pljuvačke i fecesom. Kao i drugi parvovirusi, PPV je veoma stabilan u spoljašnjoj sredini jer su infektivnost virusa, hemaglutinaciona sposobnost i antigenost veoma otporni na dejstvo temperature, promenu pH i dejstvo enzima [61].

Virus može ostati infektivan mesecima, a kontaminirana oprema i štale tako postaju izvor infekcije. Mehanički se može prenositi na odeći i glodarima [62].

Na farmama se uglavnom širi preko fecesa i drugih sekreta poreklom od akutno inficiranih svinja. Zaraženi nerastovi, takođe, mogu biti izvor infekcije [67]. Prilikom intrauterinih infekcija može se razviti imunotolerantnost fetusa na PPV koja se završava rađanjem perzistentno inficirane prasadi. Eksperimentalno je dokazano da intrauterine infekcije krmača pre 55. dana gestacije, dovode do rađanja seronegativne prasadi koja izlučuju virus do najmanje 8 meseci starosti. PPV se prenosi i polnim putem, preko sperme nerastova. Imunotolerantni nerastovi izlučuju virus najmanje 8 meseci, dok akutno inficirani najmanje 35 dana [61].

Prasad od seropozitivnih krmača su, zbog visokog titra maternalnih antitela, zaštićena 3-6 meseci. Nazimice koje se zaraze pre prvog graviditeta su, takođe, otporne na infekciju koja bi nastala u graviditetu [61].

Infekcija nastaje unošenjem virusa oronazalnim, transplacentarnim ili polnim putem [68]. PPV se za ćelijsku membranu vezuje preko glikoproteina, glikana i glikolipida odakle preko klatrinskih vezikula ili makropinoicitozom biva unet u citoplazmu. Kada virus uđe u jedro, nastaje replikacija korišćenjem ćelijskih mehanizama.

Primarno mesto replikacije je limfno tkivo odakle virus ulazi u krvotok pri čemu nastaje viremija kojom se virus prenosi do tropnog tkiva, a to su reproduktivni organi [69]. Replikacija se odigrava i u plućima, pljuvačnim žlezdama i drugim organima.

Replikacijom u perifernim limfocitima stimuliše se njihova proliferacija čime više virusa biva „odneto“ do tropnih tkiva [31].

Svinje imaju epiteliohorionski tip placentе čijih 6 slojeva u potpunosti razdvaja krvotok majke i plodova i ne dozvoljava prolaz čak ni antitela, te mehanizam nastanka infekcije fetusa nije razjašnjen. Pretpostavlja se da virus zadržava virulentnost i nakon fagocitoze makrofagima, te da oni služe za transport virusa do fetusa [31].

Subklinička limfopenija nastaje za 5 do 10 dana od početka infekcije kao posledica stalne destrukcije monocita i makrofaga koji fagocituju virus [70].

#### **2.2.3.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

Osnovni simptomi PPV infekcije su reproduktivni poremećaji kod krmača: čak i posle veštačke infekcije drugi simptomi nisu uočeni [71].

PPV infekcija se kod negravidnih, seronegativnih krmča klinički ne manifestuje, ali je praćena burnim imunološkim odgovorom uz stvaranje visokog titra zaštitnih antitela.

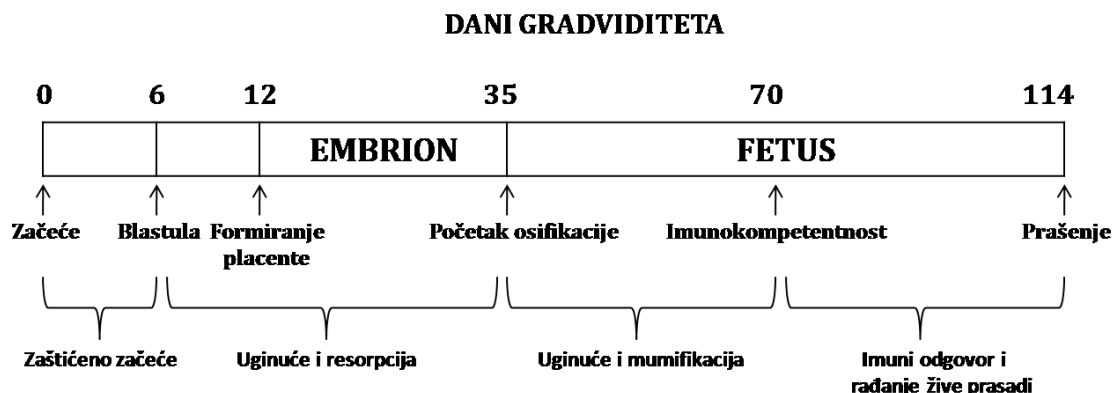
Mlada prasadi su zaštićena 3-6 meseci, u zavisnosti od kvaliteta i količine unetog kolostruma. Bolest je praćena kliničkim simptomima samo kod infekcija seronegativnih, gravidnih krmča (slika 7). Čak i tada može proći neopaženo ako se infekcija dogodi pre 35. dana gestacije kada se zbog embrionalne smrti i resorpcije ploda registruje samo povećanje krmča. Graviditet krmča kod kojih je infekcija nastala između 1. i 35. dana gestacije se može normalno nastaviti ako je preživelo više od 4 fetusa.

Infekcija koja nastaje između 35. i 55. dana gestacije rezultira infekcijom ploda, a promene na plodovima nastaju od 7 do 30 dana kasnije [65] i srazmerna su vremenu nastanka infekcije—ranija infekcija podrazumeva i veća oštećenja fetusa.

Pošto svaki fetus ima svoju posteljicu, infekcija nije istovremena i svaki fetus odgovara na infekciju individualno. Rezultat su različite kombinacije mumifikacije (uginuće oko 50-65. dana gestacije), delimične mumifikacije (uginuće 65-100. dana), zakržljalosti, rane neonatalne smrti i rađanja zdrave prasadi [65].

Kada se krmča zarazi između 55. i 80. dana gestacije, fetusi su već relativno imunokompetentni i vidljive promene su retko prisutne. Većina prasadi se rodi sa

aktivnim imunitetom i rezidualnim virusom u tkivima. Infekcije posle 80. dana gestacije se retko dešavaju zato što u tom periodu virus retko prolazi transplacentarnu barijeru [65]. Ipak, ova prasada usporeno napreduju [61].



Slika 7: Periodi gestacije koji utiču na ishod transplacentarnih infekcija [60]

Kada se svinje drže u grupama, reproduktivni poremećaji postaju uočljivi posle 2 meseca od unosa virusa, pri čemu u naredna 2-3 meseca sve svinje dođu u kontakt sa virusom. Životinje starije od 1 godine stiču imunitet, a prijemčive životinje postaju nazimice koje su izgubile pasivno stečeni imunitet [72].

Kada se svinje drže pojedinačno, širenje bolesti je nepravilno. Prijemčivih životinja ima u svim kategorijama, a reproduktivni poremećaji su sporadični [72].

Smatra se da PPV pojačava efekte PCV2 infekcije kod kliničkog toka multisistemskog oboljenja [73].

Makroskopske lezije kao posledica PPV infekcije kod krmača se ne uočavaju. Mikroskopske promene posle eksperimentalnih infekcija su infiltracija miometrijuma i endometrijalnih krvnih sudova mononuklearnim ćelijama i fokalno nakupljanje limfocita u materici. Mikroskopske promene kod fetusa su nespecifične i obuhvataju fokalnu nekrozu i mononuklearnu infiltraciju jetre, srca, mozga i bubrega [61].

### 2.2.3.5 DIJAGNOZA

Dijagnostika PPV infekcije je obavezna kada se na farmi pojave reproduktivni poremećaji, naročito embrionalna ili fetalna smrt kod nazimica, ali ne i kod krmača.

Dijagnoza se najpouzdanije postavlja laboratorijskim dokazivanjem virusa u fetusima. Za dokazivanje virusa mogu se koristiti testovi kojima se otkriva virusni antigen, genom ili izolacijom virusa. Serološka dijagnostika nije validna zbog visoke prokuženosti [61].

#### **2.2.3.6 TERAPIJA I KONTROLA**

Ranim istraživanjima PPV infekcije kod svinja, otkrivena je visoka seroprevalencija od 30% do 90% što je dovelo do razvoja inaktivisanih vakcina 1980. tih godina koje se i danas koriste za kontrolu ove bolesti [31].

#### **2.2.3.7 PPV INFEKCIJA KOD DIVLJIH SVINJA**

PPV infekcija je i kod divljih svinja veoma raširena bolest na šta ukazuje i seroprevalencija u Evropi: u Nemačkoj 77% [74], Italiji 56,7% - 99% [75], Španiji 56,6% [76], Sloveniji 49% [53] i Hrvatskoj 41,6% [77].

Kod imunih divljih svinja (maternalna antitela štite prasad do 3 meseca starosti) klinički simptomi se ne mogu uočiti, osim niže stope ovulacije kod nazimica. Ipak, zbog tropizma ka reproduktivnim organima kod mladih ženki prvi graviditet se obično završi rađanjem mumificiranih plodova, resorpcijom plodova ili abortusom. Akutne infekcije ostalih kategorija su uglavnom subkliničke. Kod zaraženih odraslih svinja patomorfološke promene se ne uočavaju. Međutim, fetusi su edematozni i različite veličine.

S obzirom na to da je seroprevalencija kod domaćih svinja značajno viša nego kod divljih, smatra se da divlje svinje ne mogu biti rezervoar PPV-a za domaće. Ipak, prenošenje je moguće u oba smera. Rizični faktori za širenje PPV infekcije kod divljih svinja su posledica ljudskog delovanja, ograđivanja i hranjenja divljih svinja koje nije u skladu sa prirodnim regulatornim mehanizmima i uslovljava agregaciju divljih svinja na malom prostoru kakva se u prirodnim uslovima nikada ne događa [68].

#### 2.2.4. INFEKCIJA SVINJSKIM CIRKOVIRUSOM 2 (PCV2)

Cirkovirus 2 svinja je primarni, etiološki uzročnik multisistemskog sindroma kržljanja prasadi (PMWS), jedne od ekonomski najvažnijih bolesti svinja širom sveta, i PCV2 pridruženih bolesti: PCV2 pneumonija kao deo kompleksa respiratornih bolesti svinja (PRDC), PCV2 enteritis, PCV2 reproduktivni poremećaji i PCV2 sindrom dermatitisa i nefropatije svinja (PDNS) [78].

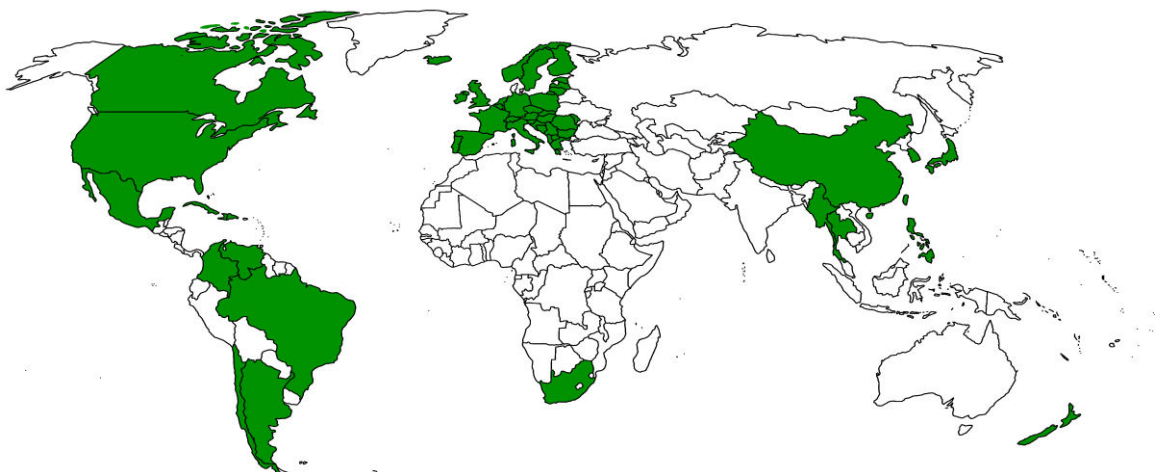
Multisistemski sindrom kržljanja prasadi je prvi put opisan u Kanadi 1991. godine kao veoma teška manifestacija PCV2 infekcije koja se karakteriše gubitkom težine, kržljanjem i generalizovanim uvećanjem limfnih čvorova [78].

##### 2.2.4.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST

Cirkoviroza svinja tip 2 je veoma raširena i gotovo da nema zapata koji nije zaražen, ali su manifestacije bolesti koje su pridružene ovoj infekciji relativno retke (slika 8).

Najveće enzootije su se dogodile u Evropi i Aziji između 1998. i 2004. godine, a u Americi između 2004. i 2007. godine. Retrospektivnim studijama utvrđeno je da su svinje bile zaražene cirkovirusom tip 2 i pre 1962, tj. obolevale od sistemske bolesti pre 1985. godine [79].

Specifična antitela protiv PCV2 su dokazana kod domaćih svinja u većini zemalja na svim kontinentima, osim Okeanije [80].



Slika 8: Zemlje u kojima je dokazana sistemska PCV2 bolest [79]

#### 2.2.4.2 ETIOLOGIJA

Cirkovirus svinja tip 2 je veoma mali, jednolančani DNK virus koji pripada porodici *Circoviridae*. Porodica *Circoviridae* obuhvata dva roda, *Circovirus* i *Gyrovirus*. U rodu *Circovirus* nalaze se virusi kanarinaca, gusaka, golubova, cirkovirus svinja tip 1 i 2. Rod *Gyrovirus* ima samo jednog člana, virus anemije živine [81]. Cirkovirusi su specifični za svog domaćina ili imaju veoma sužen broj potencijalnih domaćina. Za viruse iz ovog roda, karakteristične su subkliničke infekcije praćene padom broja leukocita [81].

PCV1 je apatogeni virus, kontaminant PK15 ćelijske linije poreklom od svinja.

PCV2 je mali virus, ikosaedarnog oblika i bez omotača. Genom mu je organizovan u kružnu, jednolančanu DNK veličine 1,8 do 2,3 kb koju čini 11 otvorenih okvira čitanja, ali funkciju gena obavljaju samo ORF1 (kodira nestrukturane proteine, replikaza Rep i Rep<sup>2</sup>), ORF2 (kodira protein kapsida) i ORF3 (kodira nestrukturani protein odgovoran za apoptozu ćelija). Protein kapsida ima imunogene karakteristike važne za stimulaciju humoralnog i ćelijskog imunološkog odgovora [81].

Filogenetskim analizama utvrđen je visok stepen nukleotidnog poklapanja između PCV2. Ipak, PCV2 je podeljen prvobitno u dva genotipa – PCV2a i PCV2b. Nakon ispitivanja arhivskih uzoraka u Danskoj, formiran je genotip PCV2c. PCV2d genotip je zastupljen u Kini, mada se danas sreće i u drugim krajevima. Koinfekcije sa više genotipova su takođe moguće [81].

Analizom aminokiselinske sekvence koju kodira ORF1 Porcine *Circovirusa* 1, utvrđen je značajan stepen homologije sa nanovirusom biljaka. Pretpostavlja se da su PCV infekcije svinja nastale unošenjem biljnih virusa koji su se rekombinovali sa virusima svinja [81].

Analizom genoma PCV2 iz Severne Amerike i Evrope utvrđeno je da virusi pripadaju istoj grupi sa grupnim nukleotidnim poklapanjem od 96%; nukleotidno poklapanje između PCV1 i PCV2 iznosi 80% [82].

Analizom ORF1 i ORF2 utvrđeno je 83% nukleotidnog i 86% aminokiselinskog poklapanja za ORF1 Porcine *Circovirusa* 1 i Porcine *Circovirusa* 2 virusa i 67% odnosno 65% poklapanja za ORF2 [83].

### 2.2.4.3 EPIZOOTIJSKI PROCES

PCV2 je veoma otporan u spoljašnjoj sredini kao i na hemijske i termičke tretmane [84].

PCV2 je specifičan za svinje dok ostale vrste kao što su goveda, ovce, koze, konji, psi, mačke, zečevi, živina i ljudi nisu prijemčivi. Neke studije su pokazale da se u miševima i pacovima može replikovati i održavati zbog čega se oni smatraju alternativnim domaćinom ili mehaničkim vektorom [85].

Virus se u organizam unosi oronazalnim putem, u čemu učestvuje kontaminirana sredina, pod, hranilice, pojilice, ograde. Bolest se prenosi i vazduhom, a posebno preko ventilacionih sistema na farmama. Obolele životinje izlučuju virus u oronazalnim sekretima i fecesom. Seropozitivni nerastovi mogu perzistentno izlučivati PCV2 – spermom, pri čemu virus ne utiče na njen kvalitet [86]. Takođe, moguće je i vertikalno prenošenje koje rezultira rađanjem perzistentno inficirane prasadi [86].

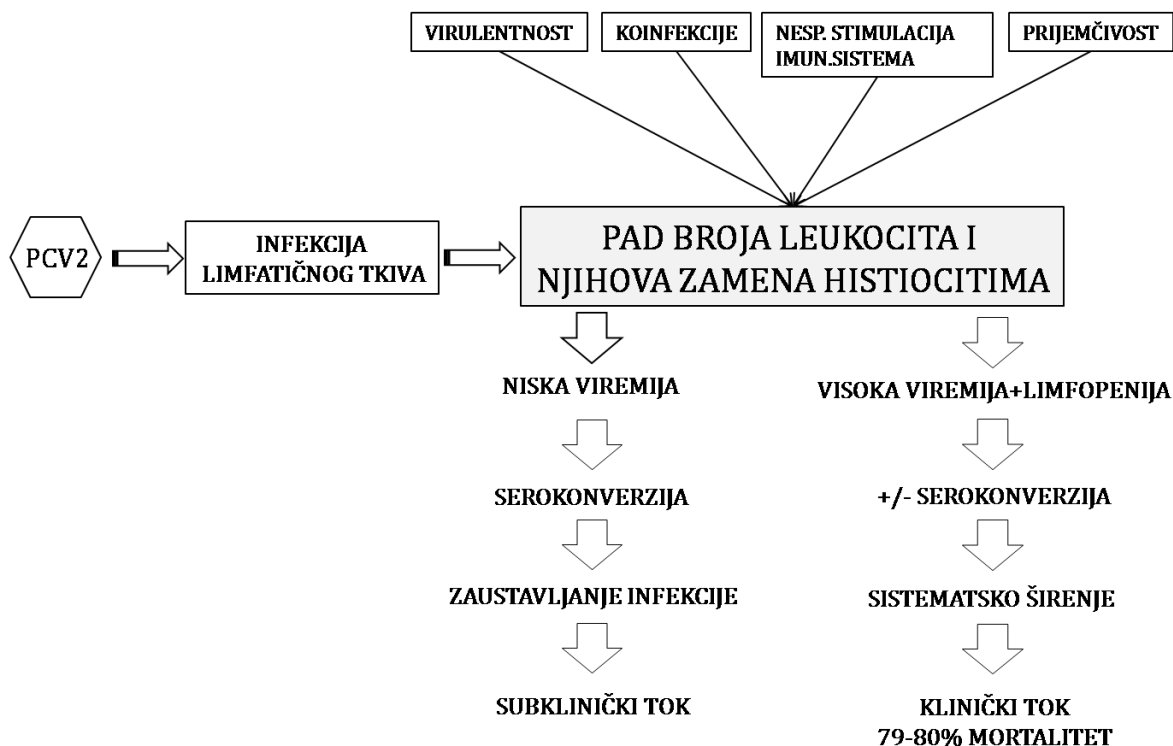
Posle ulaska virusa u organizam nastaje infekcija limfocita u tonzilama i Pajеровim pločama ( slika 9). Uslov za nastavak infekcije je da se limfociti nalaze u fazi deobe kako bi bila omogućena replikacija virusa. Replikacija može biti stimulisana i drugim patogenima. Virus koji se replikuje u makrofagima i monocitima kao što su PPV i virus PRRS-a utiču pozitivno na intenzitet replikacije PCV2 kod svinja koje su koinficirane sa više virusa. Kao posledica intenzivne replikacije, limfociti se raspadaju i oslobađaju nove virusne čestice u okolno tkivo odakle ulaze u krvotok. Nastaje primarna viremija niskog ili gotovo nedetektabilnog nivoa. Krvotokom virus dospeva do svih organa dovodeći do infekcije limfocita i u drugim limfatičnim organima kao što su limfni čvorovi, slezina, jetra, koštana srž [87].

Replikacija virusa u ovim organima uslovljava sekundarnu viremiju, pad broja limfocita i početak izlučivanja virusa fecesom i oronazalnim sekretima. Infekcija prelazi u hronično zapaljenje koje ima za cilj da ukloni mrtve limfocite i infiltrira tkivo histiocitima koji imaju ulogu tkivnih makrofaga. Kod PCV2 infekcije, akutno zapaljenje je izrazito slabo, te izostaje infiltracija tkiva neutrofilima i edem [87].

Pad broja leukocita i limfopenija u perifernoj krvi je konstantno prisutan simptom kod PCV2 infekcije koja se razvija u PMWS. Razlog limfopenije je smanjena proizvodnja



limfocita u koštanoj srži i sekundarnim limfatičnim organima i njihovo ubrzano propadanje [88].



Slika 9: Patogeneza PCV2 infekcije [89]

Pošto je PCV2 infekcija hronična, sekundarna viremija, izlučivanje virusa, pad broja limfocita mogu trajati mesecima [89].

PCV2 se izlučuje u gotovo svim sekretima i ekskretima. Prisutan je u nosnoj šupljini, bronhijama, pljuvački, konjunktivama, fecesu, urinu, mleku, spermi.

Krmače predstavljaju izvor infekcije za prasad kod kojih viremija traje čak do 28. nedelje [89].

Serološkim ispitivanjima je utvrđeno da titar pasivno prenetih antitela kod prasadi postepeno opada da bi po odlučivanju dostigao negativan nivo čime su ispunjeni uslovi za nastanak infekcije i stvaranje aktivnog imuniteta, oko 12. sedmice starosti [90].

#### **2.2.4.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

PCV2 infekcija ima nekoliko manifestacija [89]:

1. Teška sistemska infekcija poznata kao multisistemski sindrom kržljanja prasadi je najčešći oblik PCV2 infekcije. Primarni klinički simptomi obuhvataju gubitak težine, usporen rast i bledu ili ikteričnu kožu, uz smanjen broj leukocita i/ili granulomatozno zapaljenje limfatičnog tkiva. Srednje do teška limfohistiocitna inflamacija u jednom ili više drugih organa je, takođe, prisutna kod svinja odoljelih od teškog oblika PMWS.
2. PCV2 pneumonije se karakterišu kašljem i otežanim disanjem i često su posledica koinfekcije virusom PRRS-a, virusom influence svinja, Mycoplasma hyopneumonie i/ili različitim oportunističkim bakterijama. U plućima se uočavaju mikroskopske lezije koje podrazumevaju nekrotizujući ili ulcerativni bronhiolitis, bronchiolitis obliterans fibrosa, fibroplaziju u lamina propria i peribronhijalno i granulomatozno zapaljenje u alveolarnim pregradama.
3. PCV2 enteritisi su relativno retka manifestacija, uglavnom kod tovljenika, i podrazumevaju subakutni ili hronični ileitis. Svinje gube na težini i imaju dijareju tamne boje. Sluzokoža creva je veoma istanjena, a mezenterijalni limfni čvorovi povećani. Mikroskopski se uočava granulomatozno zapaljenje.
4. PCV2 reproduktivni poremećaji su sporadični, javljaju se u vidu abortusa i mumificiranih fetusa kod nazimica. Ukoliko je abortus izazvan sa PCV2, limfohistiocitni miokarditis fetusa i/ili miokardijalna fibroza je tipičan nalaz kod fetusa.
5. PCV2 dermatitis i nefropatija sindrom (PDNS) je sporadičan nalaz kod manje od 0,5% svinja. Može prethoditi ili nastati tokom PMWS.

#### **2.2.4.5 DIJAGNOZA**

Respiratorna forma PRRS-a i sve druge bolesti koje dovode do kržljanja prasadi moraju biti diferencirane od PMWS. Za PDNS, diferencijalna dijagnoza podrazumeva sve bolesti kod kojih se javlja prebojenost kože i krvavljenja u bubrezima [31].

Za postavljanje dijagnoze PMWS, moraju biti ispunjena tri uslova [89]:

1. Retardacija i kržljivost prasadi, praćeni otežanim disanjem i uvećanjem ingvinalnih limfnih ćvorova,
2. Lezije na srćanom mišiću koje se karakterišu fibroznim i/ili nekrotizujućim miokarditisom i
3. Prisustvo PCV2 u visokom titru u srcu i drugim fetalnim tkivima.

Pošto postoji jaka veza između visine titra PCV2 u tkivu i težine oboljenja, testovi kojima se kvantifikuje PCV2 imaju veoma važnu ulogu jer diferenciraju subklinićki obolele svinje od svinja obolelih od PMWS.

#### **2.2.4.6 TERAPIJA I KONTROLA**

PCV2 infekcija je multifaktorijalna bolest. Kontroliše se indirektno, smanjenjem ili uklanjanjem faktora koji dovode do njenog ispoljavanja: upotreba antibiotika, unapređenje biosigurnosti, primena osnovnih higijenskih principa, izolacija bolesnih životinja, dezinfekcija, uklanjanje stresnih faktora (prenaseljenost, loši ambijentalni uslovi), aplikacija vitamina prasadima, intraperitonealno davanje krvnih seruma od tovljenika i vakcinacija protiv drugih bolesti [91].

#### **2.2.4.7 PCV2 INFEKCIJA KOD DIVLJIH SVINJA**

PMWS je kod divljih svinja opisan u nekoliko evropskih zemalja. Seroprevalencija u Mađarskoj iznosi 20,5% [92], Sloveniji 25% [93], Španiji 29,7–40% [76], Ćeškoj 42,5% [94], Belgiji 35,6% [95] i Nemaćkoj 63,1% [96].

PCV2 se među divljim svinjama primarno prenosi kontaktom nos – na nos [97].

PMWS kod divljih svinja je opisan u starijoj dobi, 6-10 meseci, nego kod domaćih svinja, 2-4 meseca starosti i veoma retko u dobu za klanje. Histopatološke lezije kod divljih i domaćih svinja su identićne, ali se ne zna razlog zašto se simptomi kod divljih svinja pojavljuju kasnije. Utvrđeno je da pol divljih svinja nema uticaja na prijemćivost i ishod infekcije [97].

Naćin uzgajanja divljih svinja, kondicija, starost, genotip i kolićina unetog virusa utiću na nastanak PMWS. Takođe, nespecificćne aktivacije imunog sistema i druge virusne ili

bakterijske infekcije mogu biti okidač ili pojačati simptome PMWS. Poznato je da je PCV2 okidač za nastanak tuberkuloze kod divljih svinja [98].

Visoka seroprevalencija sa globalnom distribucijom ukazuje da je PCV2 infekcija enzootska kod evroazijske divlje svinje. Kako je bolest veoma raširena i kod domaćih svinja, uloga divljih svinja kao rezervoara je irelevantna [97].

Ograđivanje i hranjenje divljih svinja na veštački način povećava gustinu populacije i prostornu agregaciju čime se olakšava i ubrzava prenošenje bolesti. U prirodnim uslovima, ovaj proces se dešava znatno ređe i sporije [97].

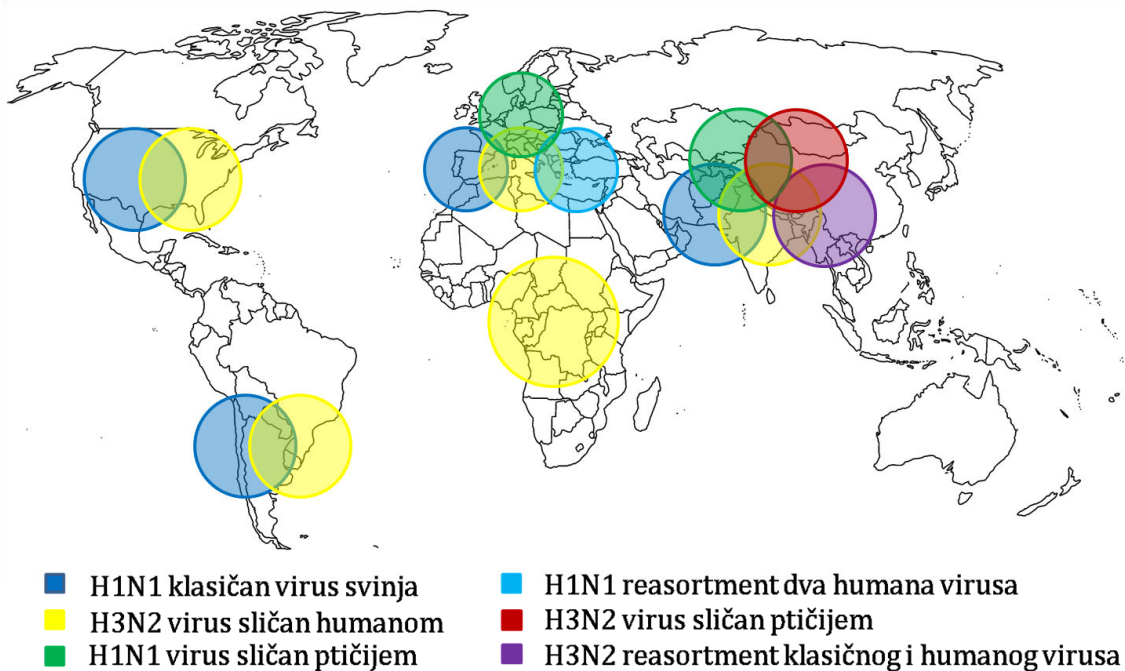
PMWS ima važnu ulogu u populacionoj dinamici intenzivno gajenih divljih svinja – uzrok je manjeg broja prasadi, ekstremno visoke seroprevalencije kod mladih divljih svinja i povećanog mortaliteta prasadi [97].

#### *2.2.5. INFLUENCA A SVINJA*

Influenca svinja je virusno oboljenje koje se karakteriše iznenadnom pojavom groznice, okulonazalnim iscetkom, slabošću i kašljem. Pored značaja za zdravlje svinja, ima važnu ulogu u javnom zdravlju. Utvrđeno je da su epidemija i epizootija influence kod ljudi i svinja 1918. godine bile uzrokovane veoma sličnim virusima, mada trenutak prelaska virusa sa svinje na čoveka ili sa čoveka na svinju i zajednički predak virusa nisu ustanovljeni [99]. Posle jednog veka od pojavljivanja, influenza svinja je i dalje važna ekonomska bolest i pretnja javnom zdravlju.

##### **2.2.5.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST**

Influenca svinja je veoma raširena bolest od koje obolevaju sve starosne kategorije svinja (slika 10). Nekada se pojavljivala u jesen i zimu, ali se sada zbog intenzivne proizvodnje svinja pojavljuje preko cele godine [100].



Slika 10: Geofraska distribucija influence svinja [100]

### 2.2.5.2 ETIOLOGIJA

Uzročnik influence svinja je virus influence tipa A, pripadnik familije *Orthomyxoviridae* u kojoj se pored roda *Influenza A* nalaze i rodovi *Influenza B*, *Influenza C*, *Thogotovirus* i *Isavirus*. Virus Influence A je pleomorfan RNK virus koji poseduje omotač, a genetski materijal je podeljen u 8 segmenata različitih veličina i kodira 11 proteina. Na površini virusa se nalaze produžeci koji nose virusne antigene, hemaglutinin i neuraminidazu. Postoji 16 različitih hemaglutinina i 9 neuraminidaza koji se mogu menjati zbog visoke stope mutacija koje karakterišu ovu celu familiju, reorganizacije genoma ili kada virus sa jedne vrste prelazi na drugu. Treći površinski protein je M2 protein koji ima funkciju protonskog kanala. Unutrašnjost omotača gradi protein matriksa, M1 [100].

Kombinovanjem 16 hemaglutinina i 9 neuraminidaza, dobijaju se 144 kombinacije od kojih je 110 već izolovano kod ptica [31].

U Evropi su kod svinja najzastupljeniji podtipovi H1N1, H3N2 humanog porekla, H1N1 ptičijeg porekla i H1N2 ( tabela 1). Ptičiji H1N1 uzrokuje blaže simptome od humanog

H3N2 i H1N1 virusa svinja [101]. Evropski H1N2 sojevi pokazuju izrazitu raznolikost u pogledu virulencije, pa su tako nemački sojevi virusa iz 2000. tih godina virulentniji od belgijskih [100].

Humani H1N1 virus ima veoma mali infektivni potencijal za svinje. Ipak, postoji nekoliko virusa izolovanih iz svinja humanog porekla. Sezonski grip ljudi, H3N2, je često otkrivan kod svinja, u Nemačkoj, Rumuniji, Velikoj Britaniji, Češkoj. Pandemijski H1N1 virus koji se pojavio 2009. godine, u više navrata se sa ljudi prenosio na svinje, u Kanadi, Norveškoj, Severnoj Irskoj, Italiji i drugim evropskim zemljama [100].

Iako je inicijalno prenošenje virusa sa ptice na svinju rezultiralo stvaranjem svinjskog H1N1 ptičijeg porekla, nema podataka o infekcijama svinja ptičijim virusima u Evropi. Sa druge strane, kasnih 80. tih i ranih 90. tih godina, najmanje tri virusa svinjskog porekla izolovana su kod ptica [100].

Tabela 1: Najčešći podtipovi virusa influence kod životinja i ljudi [100]

DOMAĆIN	STABILAN VIRUS	INCIDENTNA POJAVA VIRUSA	IZUMRLI VIRUS
<b>Čovek</b>	H1N1, H3N2, pandemijski H1N1	H1N2, H5N1, H7N1, H7N2, H7N3, H7N7, H9N2	H2N2
<b>Svinja</b>	H1N1, H3N2, H1N2	H1N7, H2N3, H3N1, H3N3, H4N6, H5N1, H5N2, H9N2, pandemijski H1N1	
<b>Konj</b>	H3N8	H1N8, H3N3	H7N7
<b>Pas</b>		H3N8, H5N1	
<b>Rakun</b>		H5N1	
<b>Kanadska kuna</b>		H3N2, H10N4	
<b>Kuna belica</b>		H5N1	
<b>Lasica</b>		H1N1	
<b>Foka</b>		H3N3, H4N5, H7N7	
<b>Kit</b>		H1N3, H13N2, H13N9	
<b>Kamila</b>		H1N1	
<b>Džinovski Mravojed</b>		H1N1	
<b>Tigar/leopard</b>		H5N1	

<b>Domaća mačka</b>		H5N1, pandemijski H1N1	
<b>Civet</b>		H5N1	
<b>Pika</b>		H5N1	
<b>Bizamski pacov</b>		H4N6	

### 2.2.5.3 EPIZOOTIJSKI PROCES

Virus influence ima širok spektar domaćina od kojih su najvažnije vodene ptice iz rodova *Anseriformes* (patke i guske) i *Charadriiformes* (galebovi i barske ptice) jer služe kao rezervoari virusa. Divlje životinje, osim divljih ptica su slučajni domaćini virusa influence. Pojava visokopatogene avijarne influence kod divljih ptica retko prati i pojava influence kod drugih vrsta. Opisani su slučajevi influence kod kuna u Švedskoj i Nemačkoj 2006. godine najverovatnije jer su se hranile uginulim pticama [102]. Od sisara, najvažniji domaćini su čovek, svinja i konj.

Danas se zna da se virus influence može prenositi između svinja, kokošaka, pataka, ćuraka, mnogih divljih ptica i ljudi. Ukoliko se svinja ili ptica zarazi istovremeno sa dva ili više sojeva virusa, postoji opasnost od reorganizacije segmenata genoma i nastanka novog soja.

Virus influence je relativno neotporan, uništava se mnogim dezinficijensima, a van domaćina ne može preživeti duže od dve nedelje [103].

Postoji nekoliko načina na koje virus influence sa novim antigenim karakteristikama ulazi na farmu svinja [104]:

1. Virus koji je prethodno bio prilagođen drugoj vrsti može se prilagoditi svinjama i uspešno cirkulisati u novom domaćinu.
2. Virus koji je prethodno bio prilagođen drugoj vrsti i virus prilagođen svinjama mogu istovremeno zaraziti svinju što može dovesti do reasortiranja gena i nastanka novog virusa koji sadrži hemaglutinin i/ili neuraminidazu antigeno različite od originalnog virusa svinja. U oba slučaja svinje nemaju antitela protiv novog virusa.

3. Tokom vremena, na genima za hemaglutinin i neuraminidazu dešavaju se mutacije koje dovode do značajnih antigenih promena virusa. Ukoliko se ovakve promene dese, prethodno stečeni imunitet nije dovoljan da neutrališe novu varijantu virusa i dolazi do reinfekcije i razvoja kliničkih simptoma.

Infekcija virusom influence nastaje nazofaringealnim putem. Virus ulazi u epitelne ćelije respiratornih puteva gde izaziva zapaljenje koje se širi na bronhije i bronhiole. Virus može biti prisutan i u alveolarnim pregradama, epitelu turbinata i medijastinalnim limfnim čvorovima.

U plućima, virus napada alveolarne pneumocite tipa 2 koji počinju da proizvode manje surfaktanta. Ovo narušava i fagocitozu sekundarnih mikroorganizama koju pneumociti 2 obavljaju. Inflamatorni eksudat zapušava male vazdušne puteve što dovodi do atelektaze, emfizema i bronhointersticijalne pneumonije. U većini slučajeva, oštećenja epitela budu zaceljena za 5 do 7 dana.

Viremija kod influence je veoma slaba, traje kratko i retko se može detektovati. Eksperimentalno je utvrđeno da izlučivanje virusa počinje posle jednog dana od veštačke infekcije i traje najdalje do 7 dana. Takođe, virus ne može biti dokazan ni u plućima već posle 7. dana od nastanka infekcije iako titar virusa u prvim danima dostiže  $>10^8$  EID [100].

Težina kliničke slike može biti ublažena aktivno ili pasivno stečenim homolognim antitelima. Uginuća su posledica sekundarnih bakterijskih ili drugih konkurentnih primarnih uzročnika pneumonije [100].

#### **2.2.5.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

Akutna influenza svinja se pojavljuje kao rezultat veoma brzog širenja virusa kroz prijemčivu populaciju. Infekcije sa H1N1, H1N2 i H3N2 su klinički slične, a bolest počinje iznenadno, posle inkubacije od 1 do 3 dana. Virus se širi preko nosnog iscetka i aerosola koji je efikasan u prenošenju virusa samo na kratkim razdaljinama. Perzistentne infekcije ili kliconoštvo kod influence nisu opisani [31].



Prisustvo aktivno ili pasivno stečenih antitela ublažava simptome, ali ne usporava širenje zaraze. Influenca je redovno enzootska na farmama koje imaju kontinuiranu proizvodnju što podrazumeva stalni priliv novih, prijemljivih životinja [31].

Bolest počinje iznenadno sa izraženim respiratornim simptomima kod većine svinja u zapatu. Obolele životinje su slabe, leže, imaju visoku telesnu temperaturu, konjunktivitis, kašlju, gube apetit. Bolest se može pogoršati do stadijuma kada svinje dišu otvorenih usta, naročito u kretanju. Oporavak počinje oko 6. dana, tako da ceo zapat preboli infekciju za oko 1 do 2 sedmice [100]. Morbiditet je 100%, a mortalitet manje od 1%. Gubici su značajni i izražavaju se kroz gubitak težine svinja i troškove lečenja. Konkurentne infekcije respiratornog trakta mogu uticati na povećanje mortaliteta.

Influenca na nivou zapata može biti produženog ili intermitentnog toka posebno kada postoje velike individualne razlike u nivou imuniteta u zapatu [100].

Reproduktivni poremećaji koji nastaju kao posledica influence su abortusi tokom akutnog toka bolesti kod krmača ili rađanje male, slabovitalne prasadi.

Patomorfološke promene su uglavnom locirane u apikalnim i kardijačnim lobusima pluća i podrazumevaju kongestiju, atelektazu, emfizem i pneumoniju. Vazdušni putevi mogu sadržati krvavo obojeni eksudat. Regionalni limfni čvorovi mogu biti umereno povećani.

Mikroskopske lezije obuhvataju degeneraciju i nekrozu epitela vazdušnih puteva i njihovu opstrukciju eksudatom, uz sporadično prisutan bronhitis i intersticijalnu pneumoniju.

U teškim slučajevima, prisutan je ograničen edem i kongestija celih pluća. Nalaz nekrotičnog bronhiolitisa pouzdan je znak influence svinja [100].

#### **2.2.5.5 DIJAGNOZA**

Za postavljanje sumnje na influencu dovoljan je iznenađan početak respiratornih simptoma istovremeno kod većine životinja, sa prisutnim tipičnim lezijama. Sumnju je važno potvrditi jer se influenza može pojaviti i u atipičnom, subakutnom obliku.

Za postavljanje dijagnoze potrebno je dokazati sam virus, antigene ili genom virusa u svežem iscedku iz nosa ili tkivu pluća kod uginulih ili eutanaziranih životinja.

Uz to, može se pratiti porast titra specifičnih antitela ispitivanjem parnih seruma.

Sama potvrda influence nije dovoljna za preduzimanje mera kontrole ukoliko nije izvršena i tipizacija virusa [31].

#### **2.2.5.6 TERAPIJA I KONTROLA**

Za sprečavanje pojavljivanja influence, moraju se poštovati striktno biosigurnosne mere. Kada virus influence uđe na farmu, veoma ga je teško iskoreniti bez kompletne depopulacije farme.

Za kontrolu se može koristiti vakcinacija. Imunizacijom vakcinom koja sadrži antigeno različit soj virusa, ali sličnog podtipa može se obezbediti delimična zaštita ublažavajući kliničke simptome, ali se ne sprečava izlučivanje virusa.

Influenca svinja je primarni patogen respiratornog sistema, ali klinička slika može drastično biti pogoršana sekundarnim bakterijskim infekcijama. Zbog toga je važno sprečiti sinergističke infekcije virusom PRRS-a i u terapiji koristiti odgovarajuće antibiotike [103].

#### **2.2.5.7 INFLUENCA A KOD DIVLJIH SVINJA**

Divlje svinje su prijemčive za viruse influence ptica i domaćih svinja i, smatra se, da služe kao rezervoari. Serološki odgovor divljih svinja na podtipove H1N1, H3N2 i H1N2, najčešće uzročnike influence domaćih svinja je dokazan u Nemačkoj, Poljskoj i Španiji, a prevalencija se kreće od manje od 1% do 8% [102]. Prevalencija u Rumuniji je viša i iznosi 18,7% [105]. Antitela na ptičiji H1N1 dokazana su kod divljih svinja u Španiji, Poljskoj i Hrvatskoj, ali ne i u Sloveniji, Rusiji i Ukrajini [102].

U Italiji je potvrđena aktivna cirkulacija virusa influence kod divljih svinja. Izolovani sojevi virusa su okarakterisani kao virusi slični ptičijim podtipa H1N1 koji su prethodno ustanovljeni kod domaćih svinja [106].

U Nemačkoj su dokazana antitela kod divljih svinja na ptičiji H1N1 i humani H3N2 tip [102]. Međutim, utvrđeno je da, iako je influenza prisutna kod divljih svinja, ne predstavlja pretnju domaćim svinjama: prevalencija virusa iznosi 0,8% [107].

Analizom nekoliko gena H3N2 virusa poreklom od divljih svinja iz Nemačke iz 2006. godine sa sojevima H3N2 poreklom od domaćih svinja iz 1993. utvrđeno je da su, iako

vremenski veoma udaljeni, ovi virusi skoro identični. Kako virusi influence pokazuju sposobnost genetičkog drifta zbog akumuliranja mutacija tokom vremena, očekivano je da se u periodu 1993-2006. pojavilo stotine varijanti virusa. Međutim, to se nije dogodilo što ukazuje da se kod divljih svinja antigeni driftovi ne dešavaju [108].

Klinički slučajevi kod divljih svinja nisu opisani.

#### *2.2.6. TRANSMISIVNI GASTROENTERITIS/INFEKCIJA RESPIRATORNIM CORONAVIRUSOM SVINJA (TGE/PRCV INFEKCIJA)*

Transmisivni gastroenteritis svinja je akutna virusna bolest svinja od koje obolevaju sve kategorije i koju karakterišu dijareja i povraćanje. Mortalitet je izuzetno visok kod prasadi mlađe od dve nedelje i opada sa starošću svinja. Postoji i enzootska forma bolesti u zapatima sa određenim stepenom imuniteta ili konkurentnom infekcijom respiratornim Coronavirusom (PRCV) svinja sa manje teškim simptomima i značajno nižim mortalitetom [109].

PRCV uzrokuje blage respiratorne simptome koji često prolaze subklinički.

Od ove bolesti obolevaju jedino svinje, mada postoji veliki broj patogenih Coronavirusa koji su uzročnici bolesti ptica i sisara [110]. Pojavljuje se preko cele godine, ali češće zimi, u gotovo svim zemljama koje imaju razvijenu proizvodnju svinja.

##### **2.2.6.1 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST**

Otkada je otkriven, virus transmisivnog gastroenteritisa je dokazan širom sveta [111].

U Evropi, prevalencija pozitivnih zapata je skoro 100%, naročito nakon pojave PRCV. TGE je veoma raširen u Severnoj Americi, a PRCV se enzootski javlja u mnogim zemljama Evrope [112] i u Severnoj Americi [113], Japanu [114], Velikoj Britaniji [115], Koreji [116] i Italiji [117]. Bolest nije prijavljena u Australiji, Novom Zelandu, Argentini, Čileu, Peruu, Urugvaju, Paragvaju, Danskoj, Švedskoj i Norveškoj.

### **2.2.6.2 ETIOLOGIJA**

Transmisivni gastroenteritis izaziva Coronavirus (TGEV). Većina izolovanih virusa je enterotropna, a srodni su mu respiratorni Coronavirus svinja, Coronavirus pasa i virus infektivnog peritonitisa mačaka [31].

Virus transmisivnog gastroenteritisa i PRCV pripadaju rodu *Coronavirus* i familiji *Coronaviridae* [118]. Coronavirusi su podeljeni u tri različite grupe i nadalje u podgrupe na osnovu njihovih genetskih karakteristika. Virus transmisivnog gastroenteritisa i PRCV pripadaju grupi 7 i podgrupi 1a [118].

PRCV je stabilni mutant virusa transmisivnog gastroenteritisa virusa. Nastao je delecijom S gena čime je izgubio tropizam ka enterocitima. Antitela protiv TGEV unakrsno reaguju sa PRCV. Zbog toga su svinje obolele od PRCV otporne na TGE u određenoj meri. U zemljama u kojima se PRCV javlja enzootski, značaj TGE je sve manji [112].

Virusi su sferičnog oblika, poseduju omotač i ikosaedarni nukleokapsid [109]. Na njihovoj površini se nalaze strukturni proteini od kojih je najvažniji S protein kao stimulator humornog i ćelijskog imunološkog odgovora. S protein poseduje hipervarijabilne domene koji omogućavaju stvaranje mutanata koji lako izbegavaju imunološki odgovor [119]. Postoji samo jedan serotip TGEV.

### **2.2.6.3 EPIZOOTIJSKI PROCES**

TGE je bolest opisana samo kod svinja, ali je serokonverzija dokazana nakon eksperimentalne infekcije kod pasa i mačaka [120]. Ptice imaju ulogu mehaničkog vektora [121].

Osnovni izvor infekcije je feces, a inkubacija traje 12-72 sata. Virus je osetljiv na promene temperature i direktno sunčevo svetlo što objašnjava pojavu bolesti uglavnom preko zime [121].

TGEV se u organizam životinje unosi oronazalnim putem. Dospevši u tanko crevo ulazi u epitelne ćelije. Kod novorođenčadi i mlade prasadi infekcija dovodi do destrukcije enterocita i gubitka njihove funkcije, atrofije crevnih resica u jejunumu i ileumu. Zbog ovakvih oštećenja potpuno je poremećeno varenje hrane, prestaje varenje laktoze kod

prasadi na sisi i dolazi do nakupljanja tečnosti u crevima, odnosno dijareje i dehidracije. Uginuća su posledica gubitka tečnosti, metaboličke acidoze i poremećenog rada srca zbog povećanja nivoa kalijuma u krvi. Kod mlade prasadi visok mortalitet je posledica velikih oštećenja enterocita koji se veoma sporo regenerišu, uz ograničenu sposobnost održavanja homeostaze [112].

Otpornost svinja na TGE zavisi od starosti. Infektivna doza za svinju staru 6 meseci je 104 puta veća nego doza za prase staro 2 dana. Sporo obnavljanje ćelija, nezreli enterociti, odsustvo imunoglobulina na rođenju, usporen ćelijski imunološki odgovor olakšavaju infekciju prasadi [112].

Krmače koje su bile u kontaktu sa virusom u kasnom graviditetu (više od 3 sedmice pre prašenja) imaju minimalne gubitke u svom leglu zbog kontinuiranog izlučivanja IgA u mleku, a ne zahvaljujući IgG u kolostrumu kako se ranije smatralo [122].

Svinja koja preživi TGE svara antitela, ali kontinuirano izlučuje virus u fecesu i nosnom iscetku najmanje 2 do 8 nedelja, ili povremeno čak 18 meseci. TGEV je moguće izolovati iz creva ili pluća čak 104 dana od nastanka infekcije [112]. Zaražene krmače prenose virus na prasad preko mleka ili fecesom. Virus se može preneti i aerogeno, ali na kratke razdaljine [121].

Kada se virus unese u prijemčivu populaciju, sve kategorije obole i zaraza poprima karakteristike epizootije. Kada na farmi postoji stalni izvor neimunih životinja, TGE može preći u hroničan oblik.

#### **2.2.6.4 KLINIČKA SLIKA I PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

TGE se na farmama svinja pojavljuje u dve forme: epizootskoj i enzootskoj.

Epizootska forma transmisivnog gastroenteritisa se pojavljuje na seronegativnim farmama tako što virus biva unet preko mehaničkih vektora, kliconoša ili kontaminiranom opremom.

Klinički simptomi, najteži kod prasadi stare 2-3 sedmice, podrazumevaju profuznu dijareju, često povraćanje, brzu dehidraciju, drhtavicu i izrazitu žeđ. Prasad slabe i veoma brzo uginu u roku od 1 do 2 dana. Prasad od imunih majki su zaštićena pasivno

prenetim antitelima. Prasad starija od 4 sedmice najčešće prežive infekciju [112]. Morbiditet je veoma visok, a mortalitet 10-20%.

Hronična ili enzootska forma se često viđa u zapatima gde krmače imaju određeni stepen imuniteta. Početak kliničkih simptoma zavisi od nivoa antitela u mleku odnosno trenutka kada prasad postaju prijemčiva, zbog opadanja titra maternalnih antitela. To je najčešće u periodu kasne laktacije ili neposredno po odbijanju (2-5 nedelja starosti). Simptomi su uglavnom blagi, posebno kod prasadi u dobroj kondiciji i uključuju dijareju, dehidraciju i gubitak telesne težine [112].

Kod tovljenika, simptomi su blagi, osim profuzne dijareje koja može trajati nekoliko dana. Povraćanje se javlja ređe. Morbiditet je visok, ali mortalitet je na niskom nivou.

Srednje teška forma se viđa kod neimunih krmača i nazimica koje su se nedavno oprasile i bile u kontaktu sa prasadima obolelim od TGE-a. One gube apetit, povraćaju, imaju dijareju, depresiju, mogu prestati sa lučenjem mleka. Potpuno se oporave za 5 do 10 dana [112].

Patomorfološke promene koje karakterišu TGE su izrazita dehidriranost organizma, istegnuta creva ispunjena penastim, žitkim, smrdljivim sadržajem i zgrušanim mlekom. Zid creva je veoma tanak, skoro providan. Želudac može biti prazan zbog povraćanja ili pak ispunjen zgrušanim mlekom. U bubrezima se nalaze žuti ili sivi urati, a u debelom crevu kiseo, vodenast sadržaj. Mikroskopskim pregledom uočava se atrofija crevnih resica, sa metaplazijom epitela i izduženim kriptama u jejunumu i ileumu [123].

Respiratorni Coronavirus svinja je prvi put opisan u Belgiji 1984. godine tokom uobičajenih seroloških analiza. Različiti PRCV su različite patogenosti za svinje i imaju različit afinitet za tkivo respiratornog trakta. U većini slučajeva, oštećenja nisu dovoljna da bi došlo do ispoljavanja kliničkih simptoma; čak i kod infekcije sa najvirulentnijim sojevima, simptomi su veoma blagi. Pneumonije koje se ponekad sreću su uglavnom posledica koinfekcije sa drugim patogenima [112].

Mikroskopski, akutne infekcije se karakterišu nekrozom bronhijalnih epitelnih ćelija, a u procesu oporavka, metaplazijom epitela. PRCV napada i epitel nosne šupljine, traheje, bronhija i bronhiola [112].

Prasad odmah po odbijanju su najosetljivija kategorija. Zaraza se širi aerosolom ili u direktnom kontaktu sa nosnim sekretom obolele svinje u kojem se virus izlučuje do 2 nedelje od infekcije [112].

#### **2.2.6.5 DIJAGNOZA**

Postavljanje dijagnoze nije uvek lako. Pozitivni serološki testovi u odsustvu digestivnih poremećaja, eksplozivna priroda bolesti sa dijarejom prisutnom kod svih kategorija svinja i visokim mortalitetom kod prasadi mogu biti osnova za postavljanje sumnje.

U laboratoriji, testom fluorescentnih antitela virus se može dokazati u isečcima creva ili PCR testom u fecesu. Osetljivost PCR je dragocena kod starije prasadi kada se virus izlučuje u mnogo manjoj meri, pa je veoma važno da test bude što osetljiviji [124].

#### **2.2.6.6 TERAPIJA I KONTROLA**

Ne postoji specifična terapija za lečenje transmisivnog gastroenteritisa. Podizanje ambijentalne temperature, rehidracija i aplikacija imunoglobulina može smanjiti gubitke. Aktivni prirodni imunitet ima zaštitnu ulogu koja traje 6-18 meseci. Vakcinacijom prirodno imunizovanih krmača, obezbeđuje se još viši nivo antitela i prirodna zaštita prasadi što je važno na farmama sa enzootkom pojavom TGE. Efikasnim se pokazala i planska infekcija krmača 2-4 nedelje pre prašenja jer se tako obezbeđuje dobar imunitet za prasad. TGE se može iskoreniti bez kompletne depopulacije planskim infekcijama krmača, primenom "sve u, sve van" principa i dobrim higijenskim merama [31].

#### **2.2.6.7 TRANSMISIVNI GASTROENTERITIS/INFEKCIJA RESPIRATORNIM CORONAVIRUSOM KOD DIVLJIH SVINJA (TGE/PRCV)**

Veoma malo se zna o Coronavirusnim infekcijama divljih svinja. U Evropi, seroprevalencija kod divljih svinja ili nije dokazana ili je na veoma niskom nivou [125]. U Nemačkoj, PRCV serorevalencija iznosi 7,78%, a TGE 1,59% [126], PRCV seroprevalencija u Sloveniji je 3% [53], a u Češkoj seroprevalencija TGE 1% [94].

U Finskoj je rađeno ispitivanje seroprevalencije kod divljih svinja koje se drže farmski, ali TGE nije utvrđen [127].



## 2.3.ULOGA I UTICAJ DIVLJIH SVINJA NA KONTROLU ZARAZNIH BOLESTI KOD DOMAĆIH SVINJA I ANALIZA RIZIKA OD NJIHOVOG PRENOŠENJA SA DIVLJIH NA DOMAĆE SVINJE

Divlje svinje su prijemčive za veliki broj patogena koji izazivaju bolesti ljudi i domaćih životinja, ali utiču i na populacionu dinamiku samih divljih svinja. One mogu imati ulogu slučajnog domaćina, vektora ili pravog rezervoara i na taj način učestvovati u epizootiološkom procesu i uticati na efikasnost kontrole zaraznih bolesti kod domaćih svinja. Kada su bolesti enzootski prisutne i veoma raširene kod domaćih svinja, kao što je često slučaj sa PMWS, uticaj divljih svinja na njihovu kontrolu nije od velikog značaja [128]. I obrnuto, od velikog značaja je za bolesti koje su iskorenjene kod domaćih svinja. Samo prisustvo divljih svinja veoma utiče na kompleksnost i efikasnost programa kontrole bolesti kod domaćih svinja i na vreme potrebno za dobijanje slobodnog statusa.

### 2.3.1 ODRŽAVANJE ZARAZNIH BOLESTI KOD DIVLJIH SVINJA

Zbog same prirode, načina života i ishrane (svaštojedi), divlje svinje hraneći se leševima lako dolaze do izvora infekcije. Rijanje ih čini veoma podesnim za nastanak infekcija koje se šire fecesom ili drugim sekretima divljih i domaćih životinja.

Dinamika populacije divljih svinja, uslovljena veličinom populacije, socijalnom organizacijom, starosnom strukturom, ima značajan uticaj na verovatnoću uspostavljanja enzootije ili statusa rezervoara kod divljih svinja [129].

#### 2.3.1.1 VELIČINA I GUSTINA POPULACIJE

Veličina grupe u kojima žive divlje svinje pozitivno utiče na mogućnost uspostavljanja statusa rezervoara. Porast broja divljih svinja podrazumeva i veći broj domaćina dostupnih za širenje bolesti i veći broj kontakata među životinjama. Pored velične, gustina populacije igra značajnu ulogu u epizootiologiji, omogućavajući veći broj

efikasnih kontakata sa obolelom životinjom ili sa kliconošom [129]. Ipak, za održavanje bolesti je potreban minimalan apsolutni broj jedinki. U tom smislu, brojne i guste populacije divljih svinja posebno predstavljaju pretnju tradicionalnom načinu držanja domaćih svinja, sa niskim nivoom biosigurnosti. Podatak o kritičnoj gustini populacije dovoljne za održavanje zaraze ustanovljen je samo za klasičnu kugu svinja i slinavku i šap. Da bi divlja svinja postala rezervoar, najmanja gustina populacije za klasičnu kugu svinja je 3/km<sup>2</sup> [130], a za slinavku i šap 2,3-14/km<sup>2</sup> [131].

#### **2.3.1.2 STAROST ŽIVOTINJA**

Prasad mlađa od 1 godine najrizičnija je kategorija za održavanje zaraze jer često perzistentno izlučuju viruse. Kada bolest uđe u prijemčivu populaciju, dolazi do visokog mortaliteta kod mladih, smanjenja fertiliteta krmača što može voditi u samoograničenje bolesti uz smanjenje gustine populacije ispod nivoa na kojem se bolest može održavati [132].

#### **2.3.1.3 SOCIJALNI STATUS I TERITORIJALNOST**

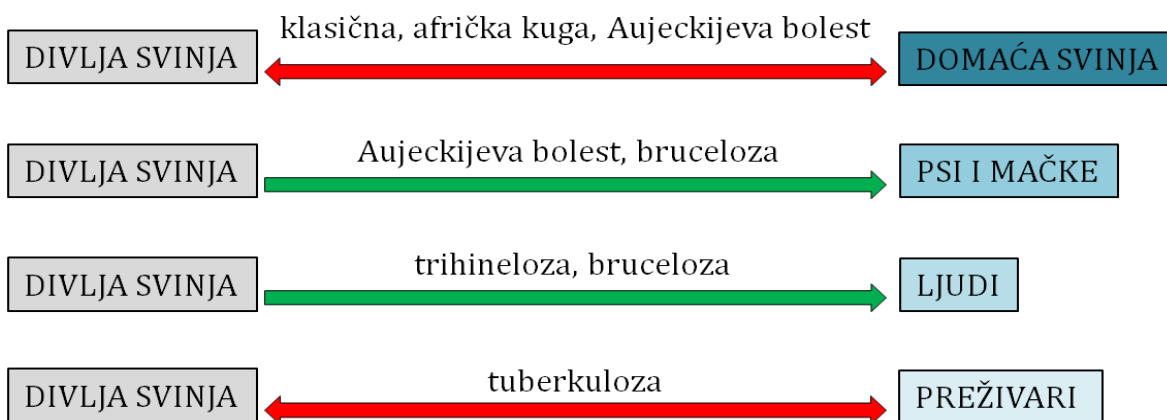
Karakteristična socijalna struktura i način života divljih svinja može favorizovati širenje bolesti naročito kada se životinje grupišu oko izvora vode ili hrane [133]. Uobičajeno je da se teritorije različitih grupa divljih svinja preklapaju što omogućava i razmenu patogena. Poznavanje površine staništa je važan podatak jer omogućava prostorno predviđanje širenja bolesti. Treba imati u vidu i potrebu divljih svinja za raseljavanjem kada mlade odlaze i do 250 km dalje od roditeljske grupe [18].

### **2.3.2 KRETANJE ZARAZA IZMEĐU DIVLJIH I DOMAĆIH SVINJA**

Smatra se da je dominantan smer kretanja zaraza od divljih ka domaćim svinjama. Izuzetak mogu predstavljati bolesti koje se prenose hranom kada bi se divlje svinje mogle zaraziti ilegalnim hranjenjem ili nepropisnim bacanjem otpadaka. U Evropi su

često beleženi slučajevi pojava zaraza usled preseljavanja divljih svinja sa jednog na drugo stanište radi sportskog lova [134].

Za pojedine bolesti, odnos domaćih i divljih svinja, uloga divljih svinja u održavanju i širenju zaraza su dobro definisani (slika 11).



Slika 11: smer širenja zaraznih bolesti između divljih svinja i domaćih životinja i ljudi

Divlje svinje imaju veoma važnu ulogu u epizootiologiji klasične kuge svinja. Ova bolest je kod divljih svinja samoograničavajuća, ali pod određenim uslovima virus može cirkulisati i po nekoliko godina [135]. Glavni izvor virusa kod pojave klasične kuge u Evropi je bio kontakt sa divljim svinjama, ilegalno hranjenje pomijama i kontaminirana prevozna sredstva [136]. Boklund i sar. [136] pretpostavljaju da se klasična kuga svinja sa domaćih svinja na divlje može preneti ukoliko je zaražena farma manje od 5 km udaljena od staništa divljih svinja.

O epizootiologiji slinavke i šapa kod divljih svinja se malo zna. Divlje svinje su prijemčive, izlučuju virus i mogu ga preneti na domaće životinje [137]. Poslednje izbijanje bolesti u Bugarskoj 2011. godine pokazalo je da se prenošenje slinavke i šapa na divlje svinje često dešava i nalazi u uzajamnoj vezi sa pojavom ove bolesti kod domaćih životinja. Eksperimentalno je dokazano da je prenošenje virusa slinavke i šapa sa divljih svinja na domaće životinje *et vice versa* moguće, ali za prirodne uslove

ovo ne može biti pravilo. Epizootiološki modeli za simulaciju širenja i održavanja slinovke i šapa u populaciji divljih svinja ukazuju da ova bolest nije samoodrživa već vremenski i prostorno ograničena [138].

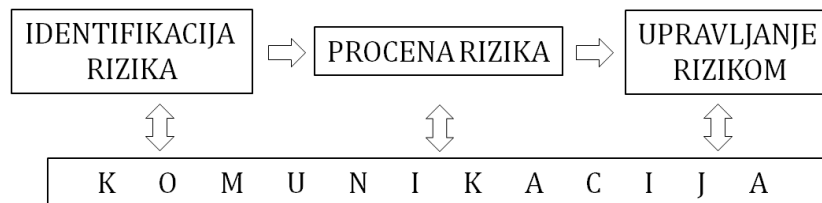
Od afričke kuge obolevaju i domaće i divlje svinje, ali se virus umnožava i u krpeljima iz roda *Ornithodoros* [139]. Evropska divlja svinja je veoma prijemčiva i ispoljava kliničke simptome identične simptomima kod domaćih svinja. Suprotno njima, klinička slika kod afričkih vrsta svinja je subklinička i asimptomatska [140]. Istraživanjem afričke kuge svinja u Rusiji je utvrđeno da domaće svinje imaju glavnu ulogu u širenju ove bolesti prenoseći je i na divlje svinje. Cirkulacija virusa kod divljih svinja je uslovljena gustom populacije, a prenošenje virusa na domaće svinje se dešava veoma retko [141]. Zbog toga je procenjeno da je rizik od nastanka enzootije kod divljih svinja u Gruziji, Jermeniji i Rusiji srednji, dok u Ukrajini i Belorusiji nizak, uglavnom zbog prenošenja virusa sa domaćih svinja na divlje [142].

Za Aujeckijevu bolest, domaće i divlje svinje su prirodni domaćini. Da je prenošenje sa domaćih na divlje i obrnuto moguće dokazano je u eksperimentalnim uslovima [40]. Opšte je prihvaćeno da divlje svinje mogu imati ulogu rezervoara jer se bolest može održavati u latentnom obliku što omogućava izlučivanje virusa i prenošenje oronazalnim i polnim putem [143]. Ipak, dešava se da, tamo gde je bolest iskorenjena kod domaćih svinja, nisu zaražene ni divlje svinje, što govori u prilog činjenici da je širenje sa domaćih na divlje mnogo lakše i efikasnije, kao i da su sojevi od divljih svinja manje patogeni za domaće [144].

### 2.3.3 ANALIZA RIZIKA

Analiza rizika je alat koji se u epizootiologiji koristi za utvrđivanje postojanja i stepena rizika po zdravlje životinja i ljudi.

Analiza rizika se sastoji od 4 komponente: identifikacije, procene, upravljanja i komunikacije rizikom (slika 12) [145].



Slika 12: Shematski prikaz procesa analize rizika

Pri proceni rizika, prvo se identifikuje i opisuje sam rizik od nekog događaja. Potom se utvrđuje verovatnoća da se isti dogodi i procenjuju posledice.

Za procenu rizika mogu se koristiti kvantitativne ili kvalitativne metode. Rizik se opisuje kao ekstremno visok, visok, srednji i nizak ili na neki drugi način, numerički, brojevima od 1 do 5, na primer. Preporučuje se da se za egzotične bolesti koristi metoda kvalitativne procene rizika. Za mnoge bolesti postoje usvojeni internacionalni standardi koji ne zahtevaju primenu matematičkih modela. Upravljanje rizikom omogućava da se smanji sam rizik kao i posledice, pri čemu rizik nikada ne može biti eliminisan, ali se može dovesti na prihvatljiv nivo. Komunikacija podrazumeva razmenu informacija i mišljenja između svih strana koje na bilo koji način mogu biti pogođene rizikom i posledicama [145].

Kvalitativnom analizom rizika mogu se proceniti verovatnoća i potencijalni uticaj prenošenja bolesti sa divljih na domaće svinje.

Poznavanje puteva širenja koji su svojstveni svakoj bolesti ponaosob su osnova za početak istraživanja i procenu rizika od prenošenja bolesti sa divljih na domaće svinje. Najveći rizik postoji za bolesti koje se šire aerosolom jer su time sve svinje koje su napolju izložene riziku. Rizik je najmanji za bolesti koje se prenose polnim putem. Svinje koje se drže napolju, ograđene niskom električnom ogradom, udaljene do 500 m od šume u kojoj žive divlje svinje, posebno ukoliko se gaji rasa Mangulica su izložene velikom riziku od kontakta sa divljim svinjama. U ovakvim uslovima, u Engleskoj, sezonske razlike nisu uočene i kontakti se ostvaruju preko cele godine [146].

Divlje svinje više privlače ženke nego hrana, pa je farma krmače takođe pod većim rizikom.

Starost svinja takođe predstavlja faktor rizika. Uočeno je da su pod najvećim rizikom prasadi, a za njima srednje stare svinje i kategorije pred polnom zrelošću, a najmanje odrasle svinje. Ukoliko se posmatra obrnuti smer kretanja zaraza, od domaćih ka divljim svinjama, važi isto pravilo da su najmlađe kategorije i najosetljivije [146].

Upravljanje farmom domaćih svinja, principi kategorizacije i grupisanja svinja, premeštanje životinja, utiču na izloženost svinja većem riziku od obolevanja. Najveći rizik predstavlja držanje svih kategorija svinja u jednom objektu [146].

Prirodno ponašanje divljih svinja se može uporediti sa sistemom upravljanja na farmi domaćih svinja. Kod divljih svinja sve starosne kategorije žive zajedno, grupu čine ženke različite starosti i njihova prasadi. Kontakti sa drugim životinjama se povećavaju sa starošću i sa odlaskom mladih i dolaskom nerastova radi parenja [146].

Domaće svinje se drže u velikim zaptima, preko 500 životinja, gde i gustina ima veoma veliki značaj. Infektivni pritisak kod domaćih svinja je značajno veći nego kod divljih jer one žive u znatno manjim grupama. Čak i najgušće populacije nisu za poređenje sa zaptima domaćih svinja (0,7 svinja/m<sup>2</sup>) [146].

Stres kod domaćih svinja ima važnu ulogu u epiziotologiji i patogenezi mnogih bolesti. On se javlja prilikom odlučivanja prasadi, uvođenja u nove grupe, zbog novih životinja u grupi itd. Slične stresne situacije preživljavaju i divlje svinje posebno u periodu raseljavanja.

Način lova ili način upravljanja lovištima značajno utiče na rezultate analize rizika jer omogućava disperziju zaraze [146].

### 3 CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

#### **Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:**

1. Ispitivanje uzoraka poreklom od divljih svinja iz centralne Srbije molekularnim, virusološkim i serološkim metodama na prisustvo virusa i specifičnih antitela protiv Aujeckijeve bolesti (MA, PRV), parvoviroze (PPV), transmisivnog gastroenteritisa (TGE), cirkoviroze (PCV2), reproduktivnog i respiratornog sindroma (PRRS) kao i influence A (SIV).
2. Utvrđivanje trenda pojavljivanja nabrojanih bolesti tokom trogodišnjeg vremenskog perioda, kao i geografska rasprostranjenost i lociranje područja u kojima postoji rizik od prenošenja bolesti sa divljih na domaće svinje.
3. Poređenje dobijenih rezultata sa već postojećom bankom virusa sa teritorije Republike Srbije, kao i sekvenciranje delova genoma i poređenje sa istim sekvencama virusa izolovanih iz domaćih svinja; na osnovu dobijenih rezultata uradila bi se filogenetska analiza i utvrdila srodnost izolata poreklom od domaćih i divljih svinja.

#### **Zadaci istraživanja ove doktorske disertacije su:**

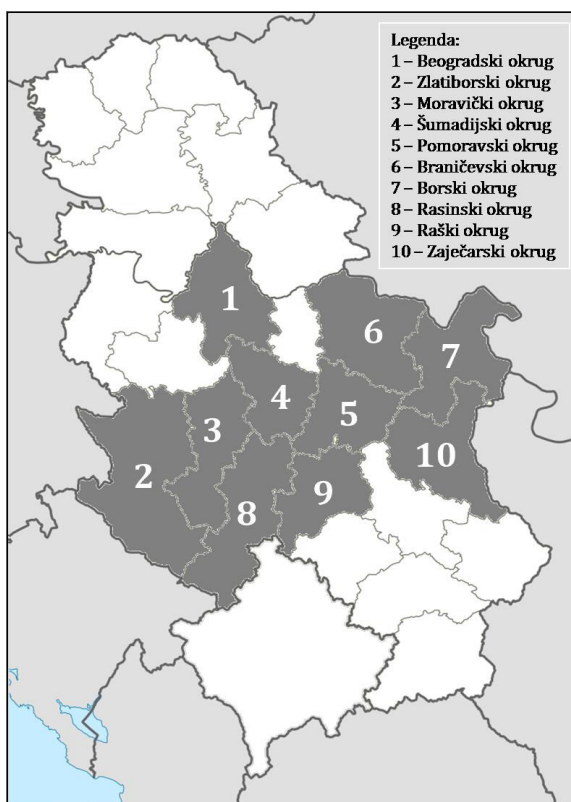
1. Prikupljanje uzoraka krvnih seruma divljih svinja sa područja beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog okruga; prikupljanje uzoraka krvnih seruma i organa od divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti;
2. Ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv uzročnika MA, PPV, TGEV/PRCV PCV2, PRRS i SIV;
3. Ispitivanje uzoraka organa od bolesnih divljih svinja na prisustvo uzročnika navedenih virusnih bolesti molekularnim metodama;
4. Izolacija i molekularna karakterizacija izolovanih sojeva i poređenje sa sojevima virusa iz domaćih svinja;
5. Analiza rezultata u odnosu na utvrđenu vremensku i prostornu distribuciju bolesti kod divljih svinja i gustinu i lokaciju domaćih svinja;
6. Analiza rizika od širenja nabrojanih virusnih bolesti sa divljih na domaće svinje.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1 MATERIJAL

Za potrebe ovog ispitivanja korišćeni su uzorci poreklom od divljih svinja sa područja 10 okruga centralne Srbije: beogradski, borski, braničevski, moravički, pomoravski, rasinski, raški, šumadijski, zaječarski i zlatiborski, slika 13.

U ispitivanju su korišćeni krvni serumi i organi divljih svinja izlovljenih tokom redovnih sezona lova u periodu 2012-2014. godine, kao i divlje svinje koje su pokazivale znakove bolesti izlovljene tokom 2014. godine. U cilju poređenja i



karakterizacije sojeva virusa izolovanih iz divljih svinja, korišćeni su ranije izolovani virusi Aujeckijeve bolesti kod pasa i domaćih svinja u Srbiji za koje su nukleotidne sekvence dostupne u banci gena NCBI (National Center for Biotechnology Information) za us9, ul49,5 i us4 gene: PRV/domaća svinja/2009: KT187319, KT187325, KT187313; PRV/pas/2010: KT187318, KT187324, KT187312; PRV/domaća svinja/2014: KT187320i KT187326 KT187314. Takođe, korišćene su i druge dostupne sekvence iz NCBI, tabela 2.

Slika 13: Okruzi iz kojih su poticali uzorci za ispitivanje



Tabela 2: Nukleotidne sekvence iz banke gena koje su korišćene za filogenetsku analizu virusa Aujeckijeve bolesti

<b>NCBI broj</b>	<b>Soj</b>	<b>JQ809330.1</b>	DUL34Pass
<b>KJ17942.1</b>	Kaplan	<b>AY190527.1</b>	Ea
<b>JF797217.1</b>	Bartha	<b>KJ789182.1</b>	TJ
<b>KP098534.1</b>	HeN1	<b>KP257591.1</b>	JS-2012
<b>KM061380.1</b>	ZJ01	<b>AF251220.1</b>	Pseudorabies v. Ea
<b>KC981239.1</b>	BJ/YT	<b>KM676290.1</b>	SC
<b>JF797219.1</b>	Becker		

#### 4.1.1 KRVNI SERUMI

Za svaku od 3 navedene godine, odabrano je po 200 krvnih seruma divljih svinja za serološka ispitivanja. Za svaki okrug je pregledan broj uzoraka dat u tabeli 3.

Tabela 3: Broj ispitanih uzoraka krvnih seruma po okrugu i godini

<b>Okrug</b>	<b>Broj uzoraka</b>		
Beogradski	5	Rasinski	20
Borski	30	Raški	20
Braničevski	25	Šumadijski	10
Moravički	10	Zaječarski	30
Pomoravski	25	Zlatiborski	25
		<b>UKUPNO</b>	<b>200</b>

Pored uzoraka iz redovnog odstrela, pregledano je 50 krvnih seruma divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti.

Krvni serumi su pregledani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PRRS,-a PRV, PPV, PCV2, SIV i TGEV/PRCV.

#### 4.1.2 ORGANI

Divlje svinje koje su pokazivale znakove bolesti, izlovljene tokom 2014. godine pregledane su molekularnim metodama na prisustvo genoma uzročnika virusnih bolesti enzoetskog potencijala. Ukupno je pregledano 50 uzoraka organa, slezine i bubrega. Uzorci za ova ispitivanja poticali su iz 6 okruga, tabela 4.

Tabela 4: Broj uzoraka ispitanih organa po okrugu

<b>Okrug</b>	<b>Broj uzoraka</b>		
Borski	6	Pomoravski	2
Braničevski	18	Raški	4
Moravički	8	Zaječarski	12
		<b>UKUPNO</b>	<b>50</b>

Molekularne metode su korišćene kao trijažne, da bi se iz uzoraka u kojima je dokazan genom izvršila izolacija virusa na kulturi tkiva i identifikacija izolovanih sojeva virusa primenom virus neutralizacionog testa, direktne imunofluorescencije i histološkim bojenjem ćelija hematoksilin eozinom.

Molekularna karakterizacija izolovanih sojeva virusa je izvršena sekvenciranjem i filogenetskom analizom.

#### *4.1.3 REFERENTNI MATERIJALI*

U virus neutralizacionom testu za serološku dijagnostiku Aujeckijeve bolesti je korišćen referentan soj virusa PRV NIA 3 (CVI Wageningen, Lelystad, Holandija).

PPV NADL-2 (ATCC® VR-742) je referentan soj Parvovirusa svinja koji je korišćen u testu inhibije hemaglutinacije.

Izolacija virusa je izvršena na kontinuiranim ćelijskim linijama PK15 – BS CL 72, MDBK – BS CL 63, RK13.6 – Bs CL 196 (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna „Bruno Ubertini“). Identifikacija PRV-a je izvršena neutralizacijom virusa upotrebom antiseruma PRV S1, S2, S3 (CVI Wageningen, Lelystad, The Netherlands).

Na PK15 ćelijskoj liniji je izveden i virus neutralizacioni test za dijagnostiku Aujeckijeve bolesti.

## 4.2 METODE

### 4.2.1 METODE ZA DOKAZIVANJE SPECIFIČNIH ANTITELA

#### 4.2.1.1 ELISA TEST ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU PRRS-a

Za serološku dijagnostiku PRRS-a je korišćen komercijalni ELISA kit INGEZIM PRRS UNIVERSAL, ING 1.1PRU.K1, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija. Ovo je indirektna ELISA u kojoj je kao antigen korišćen prečišćen virusni antigen dobijen ekspresijom ORF7 američkih i evropskih sojeva virusa PRRS-a u *E.coli*. Oprema koja je korišćena za izvođenje testa je navedana u tabeli 5<sup>3</sup>:

Tabela 5: Spisak opreme koja je korišćena za izvođenje ELISA

NAZIV OPREME	TIP	PROIZVOĐAČ	SERIJSKI BROJ
Inkubator za ploče	1PS	Bio Rad	0101 2932
Mešalica za mikrotitar ploče	715+	ASAL	829
Ispirač mikrotitar ploča	Well wash	Thermo	888-381A
Spekrtofotometar	Multiscan MS	Lab Systems	352002724
Univerzalna centrifuga	260R	MPW	10260R02131

Postupak izvođenja testa prema instrukcijama proizvođača:

- Ispitujuće serume razrediti u odnosu 1:100 sa DE13-01.
- Sipati 100 µl pozitivne i negativne kontrole i 100 µl uzoraka u bunare mikrotitar ploče. Ploču prelepiti samolepljivom folijom i inkubirati 1h na 37 °C.
- Nakon inkubacije, ploču isprati 4 puta da bi se nevezana antitela odstranila i dodati 100 µl sveže pripremljenog konjugata u sve bunare. Ploču prelepiti samolepljivom folijom i inkubirati 45 min na sobnoj temperaturi.

---

<sup>3</sup> Ista oprema korišćena je za izvođenje svih ELISA testova.

- Ponoviti postupak ispiranja (5x) i dodati 100  $\mu$ l sveže pripremljenog supstrata u sve bunare. Ploču inkubirati 15 min na sobnoj temperaturi i zaustaviti obojenu reakciju dodavanjem 100  $\mu$ l stop rastvora u sve bunare.
- Očitati vrednosti optičke gustine (OD) na talasnoj dužini od 405 nm. Test se smatra validnim ako je OD vrednost pozitivne kontrole veća od 1,5 i OD vrednost negativne kontrole manja od 0,250.
- Interpretacija rezultata: Granična vrednost se izračunava na sledeći način:

$$0,15 \times \text{OD pozitivne kontrole}$$

Uzorci kod kojih je očitana OD vrednost veća od granične vrednosti se smatraju pozitivnim na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PRRS-a.

Uzorci kod kojih je očitana OD vrednost manja od granične vrednosti se smatraju negativnim na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PRRS-a.

#### **4.2.1.2 VIRUS NEUTRALIZACIONI TEST ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU AUJECKIJEVE BOLESTI**

Virus neutralizacioni test je korišćen za dokazivanje i određivanje titra specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti. Test je izveden u 96 bunarskim mikrotitar pločama sa ravnim dnom (Sarstedt, Nemačka) na ćelijskoj liniji PK15[147]. Radno razređenje referentnog virusa Aujeckijeve bolesti koje je korišćeno u testu je 100TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l. Prilikom izvođenja testa postavljene su pozitivna i negativna kontrola, kontrola citotoksičnosti ispitujućih seruma, kontrola rasta ćelija, kontrola titra radnog razređenja virusa i kontrola virusa.

Oprema koja je korišćena za izvođenje ovog testa je navedena u tabeli 6.

Tabela 6: Spisak opreme koja je korišćena za izvođenje virus neutralizacionog testa

<b>NAZIV OPREME</b>	<b>TIP</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>	<b>SERIJSKI BROJ</b>
Biohazard kabinet klase II	VBH48C2	WHB steril	16706
CO <sub>2</sub> inkubator	CO170R-230-1000	NewBrunswick	36378
Mikroskop invertni fluorescetni	090-135-002	LEICA	621228/244148
Univerzalna centrifuga sa hlađenjem	351R	MPW	10241R020711
Biohazard kabinet klase II	VE180 PLUS	Aqaria	006/11
CO <sub>2</sub> inkubator	-	Binder	CB150#0348
Invertni svetlosni mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss	3832001345
Biohazard kabinet klase II	VE90 PLUS	Aqaria	001/11

Postupak izvođenja testa:

- Pripremiti uzorke krvnih seruma inaktivacijom komplementa na 56 °C tokom 30 min.
- Napraviti 50 µl dvostrukih serijskih razređenja seruma u minimalnoj esencijalnoj podlozi sa Erlovim solima (MEM: Gibco BRL, SAD), 1:4-1:256, direktno u mikrotitracionoj ploči.
- Serumima dodati 50 µl radnog razređenja virusa.
- Ploče inkubirati 1 h na 37 °C sa 5% CO<sub>2</sub> nakon čega se u svaki bunar dodaje 150 µl suspenzije PK15 ćelija sa 10% FTS (FBS: Gibco BRL, SAD).
- Ploče inkubirati 4 dana na 37 °C sa 5% CO<sub>2</sub>.
- Posmatrajući pojavu citopatogenog efekta pod svetlosnim mikroskopom, očitati rezultate i odrediti titar specifičnih antitela. Titar antitela se iskazuje kao recipročna vrednost najvećeg razređenja seruma koje je u potpunosti sprečilo (100%) citopatogeni efekat virusa.

#### **4.2.1.3 TEST INHIBICIJE HEMAGLUTINACIJE ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU PPV INFEKCIJE SVINJA**

Određivanje prisustva i visine titra specifičnih antitela protiv PPV svinja je izvedeno testom inhibicije hemaglutinacije u 96 bunarskoj mikrotitar ploči sa U dnom (Sarstedt, Nemačka) [65]. Prilikom izvođenja testa postavljene su pozitivna i negativna kontrola, kontrola eritrocita, kontrola radnog razređenja virusa (4HA) i kontrola virusa.

Postupak izvođenja testa:

- Pripremiti krvne serume inaktivacijom komplementa na 56 °C tokom 30 min i uklanjanjem nespecifičnih hemaglutinina. Na 25 µl inaktivisanih seruma dodati 75 µl rastvora kaolina i inkubirati na sobnoj temperaturi 20 min. Kaolin istaložiti centrifugiranjem na 1000 g tokom 20 min i potom dodati 25 µl 20% eritrocita zamorca (Torlak, Srbija). Nakon 1 h inkubiranja na sobnoj temperaturi, pripremljene serume centrifugirati 10 min na 1000 g i koristiti u daljoj proceduri. Na ovaj način su uklonjeni nespecifični aglutinini iz seruma.
- Napraviti dvostruka serijska razređenja pripremljenih seruma mešanjem 50 µl PBS-a i iste zapremine pripremljenih seruma.
- Razređenjima seruma dodati 50 µl radnog razređenja (4HA) virusa.
- Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h, dodati 50 µl 0,5% eritrocita i ponoviti inkubaciju u istim ambijentalnim uslovima i istog trajanja.
- Očitavanje rezultata se obavlja posmatranjem ploče pod uglom od 70°. Heminhibicioni titar antitela u serumu je najveće razređenje seruma koje dovodi do potpune inhibicije hemaglutinacije eritrocita.

#### **4.2.1.4 ELISA TEST ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU PCV2 INFEKCIJE KOD SVINJA**

Za dokazivanje IgG i IgM specifičnih antitela protiv PCV2, korišćen je Ingezim Circovirus IgG/IgM ING1.1.PCV.K.2, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija.

Ovaj test je sendvič ELISA u kojoj su IgG i IgM svinja “uhvaćeni” između heterolognih antitela protiv svinjskih IgG i IgM imunoglobulina i antigena PCV2.

Postupak izvođenja testa, prema uputstvu proizvođača:

- U ispitivanju se koriste 2 mikrotitar ploče, odvojeno za IgG i IgM. Serumi koji su razblaženi 1:100, kao i pozitivna i negativna kontrola, se u zapremini od 100 µl sipaju u bunare obe ploče koje se zatim inkubiraju 1 h na 37 °C.
- Uklanjanje nevezanih komponenti se vrši četverostrukim ispiranjem, nakon čega se dodaje 100 µl antigena koji je obeležen peroksidazom. Reakcija vezivanja antigena i antitela se dešava tokom narednog koraka inkubacije od 30 min na 37 °C.
- Ponoviti postupak ispiranja i dodati 100 µl supstrata.
- Razvijanje obojene reakcije u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi zaustaviti dodavanjem 100 µl stop rastvora. Intenzitet obojenosti reakcije se očitava na 450 nm. Test je validan ako je OD vrednost pozitivnih kontrola za IgG i IgM >0,7, a negativnih <0,3.

○ Interpretacija rezultata:

Granična vrednost za IgM se izračunava množenjem OD vrednosti pozitivne kontrole sa 0,4 (ODPC x 0,4).

Granična vrednost za IgG se izračunava množenjem OD vrednosti pozitivne kontrole sa 0,3 (ODPC x 0,3).

Uzorci kod kojih je izmerena OD vrednost niža od graničnih se smatraju negativnim.

Uzorci kod kojih je izmerena OD vrednost viša od graničnih i  $IgG > IgM$  se smatraju pozitivnim s tim da je infekcija nastala pre 1-2 meseca.

Uzorci kod kojih je izmerena OD vrednost viša od graničnih i  $IgM > IgG$  se smatraju pozitivnim, s tim da se radi o aktivnoj infekciji.

Uzorci kod kojih je izmerena OD vrednost za IgG viša od granične, a za IgM niža od granične vrednosti se smatraju pozitivnim s tim da se radi o infekciji staroj više od 2 meseca.

#### **4.2.1.5 ELISA TEST ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU INFLUENCE A KOD SVINJA**

Komercijalni kit, INGEZIM Influenza A, ING 1.0.FKU.K.3, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija, je korišćen za dokazivanje specifičnih antitela protiv virusa Influenza A kod svinja. Ovaj test je blokirajući imunoenzimski test namenjen serološkoj dijagnostici influence kod živine i svinja.

Postupak izvođenja testa, prema uputstvu proizvođača:

- Uzorke krvnih seruma za ispitivanje pripremiti u razređenju 1:2, mešanjem 50 µl seruma i 50 µl razređivača direktno u mikrotitar ploči. U odgovarajuće bunare sipati 100 µl pozitivne i negativne kontrole.
- Ploču prelepiti samolepljivom folijom i inkubirati 1 h na 37 °C.
- Nakon ispiranja (4x), dodati 100 µl konjugata, ploču prelepiti samolepljivom folijom i ponoviti inkubaciju u trajanju od 30 min na 37 °C.
- Ponoviti postupak ispiranja od 5 ponavljanja i dodati 100 µl supstrata.
- Nakon inkubacije od 10 min potrebne za razvijanje boje, dodati 100 µl stop rastvora i očitati vrednosti optičke gustine na 450 nm. Test je validan ako je odnos OD vrednosti negativne i pozitivne kontrole veći ili jednak 0,3 (ODNC/ODPC ≥0,3).
- Interpretacija rezultata: za svaki ispitujući serum se izračunava procenat blokiranja prema obrascu:

$$\% \text{ blokiranja} = \text{OD uzorka} / \text{OD NC} \times 100$$

Ukoliko je % blokiranja uzorka >30% smatra se da su antitela protiv virusa influence A odsutna u uzorku – uzorak je negativan i obrnuto, ukoliko je % blokiranja uzorka ≤ 30% uzorak je pozitivan na prisustvo specifičnih antitela.

#### **4.2.1.6 ELISA TEST ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU TRANSMISIVNOG GASTROENTERITISA/INFEKCIJE RESPIRATORNIM CORONAVIRUSOM SVINJA**

Komercijalni kit, Ingezim Corona Diferencial 2.0, 11.DIF.K3, proizvođača INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A, Španija je blokirajući imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv virusa transmisivnog gastroenteritisa i



njihovo razlikovanje od antitela protiv PRCV. Test je zasnovan na upotrebi dve vrste monoklonskih antitela, jednih usmerenih protiv specifičnog epitopa virusa TGE (konjugat B) i drugih usmerenih protiv epitopa koji je identičan kod TGEV i PRCV (konjugat A), kao i rekombinantnih antigena vezanih na dno ploče.

Test je izveden prema uputstvu proizvođača:

- U ispitivanju se koriste krvni serumi razblaženi u odnosu 1:2 sa obezbeđenim razređivačem. Ispitujući uzorci, dve pozitivne i negativna kontrola ispituju se u duplikatu i inkubiraju u 96 bunarskoj ploči na kojoj su vezani rekombinantni antigeni virusa tokom 1 h na 37 °C.
- Uklanjanje nevezanih komponenti se vrši trostrukim ispiranjem, nakon čega se dodaje 100 µl konjugata A i konjugata B. Vezivanje konjugata za slobodne epitope se odvija tokom narednog koraka inkubacije od 30 min na 37 °C.
- Ponoviti postupak ispiranja (6x) i dodati 100 µl supstrata.
- Razvijanje obojene reakcije u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi zaustaviti dodavanjem 100 µl stop rastvora. Intenzitet obojenosti reakcije se očitava na 450 nm. Test je validan ako je:
  - OD vrednost pozitivne kontrole za TGEV sa konjugatom A < 0,3
  - OD vrednost pozitivne kontrole za TGEV sa konjugatom B < 0,3
  - OD vrednost pozitivne kontrole za PRCV sa konjugatom A < 0,3
  - OD vrednost pozitivne kontrole za PRCV sa konjugatom B > 0,7
  - OD vrednost negativne kontrole sa konjugatom A > 1,0
  - OD vrednost negativne kontrole sa konjugatom B > 1,0
- Interpretacija rezultata.
  - A-granična vrednost - Granična vrednost za procenu prisustva/odsustva antitela protiv Coronavirusa se izračunava množenjem OD vrednosti negativne kontrole sa konjugatom A sa 0,4 ( $OD_{NC_{konj A}} \times 0,4$ ).
  - B-granična vrednost - Pozitivna granična vrednost za TGE se izračunava množenjem OD vrednosti PRCV pozitivne kontrole sa konjugatom B sa 0,6 ( $OD_{PC_{PRCV/konj B}} \times 0,6$ ).

C-granična vrednost - Negativna granična vrednost za TGE se izračunava množenjem OD vrednosti PRCV pozitivne kontrole sa konjugatom B sa 0,7 ( $OD_{PC_{PRCV}/konj\ B} \times 0,7$ ).

Interpretacija rezultata se odvija u dva koraka. Prvi je utvrđivanje prisustva antitela protiv Corona virusa poređenjem OD vrednosti uzoraka sa izračunatom A-graničnom vrednošću.

Uzorci sa vrednostima višim od A vrednosti se smatraju negativnim na prisustvo specifičnih antitela protiv PRCV i TGEV.

Uzorci sa nižim vrednostima od A granične vrednosti se nadalje tumače u sledećem koraku poređenjem sa graničnim vrednostima B i C. Na ovaj način se vrši razlikovanje antitela na TGEV i PRCV.

Uzorci sa OD vrednošću nižim od B vrednosti se smatraju pozitivnim na prisustvo antitela protiv TGEV. Uzorci sa OD vrednošću višim od C vrednosti se smatraju negativnim na prisustvo antitela protiv TGEV, ali pozitivnim na prisustvo antitela protiv PRCV.

Uzorci čija je OD vrednost između B i C granične vrednosti se smatraju sumnjivim na prisustvo antitela protiv TGEV, ali pozitivnim na prisustvo antitela protiv PRCV.

#### *4.2.2 METODE ZA DOKAZIVANJE GENOMA VIRUSA*

Za izvođenje molekularnih metoda iz uzoraka organa divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti, organi su prethodno pripremljeni kao 10% suspenzija u PBS-u koja je, nakon stajanja na sobnoj temperaturi od 1 h, centrifugirana 10 min na 900 g. Za dalji postupak je korišćen supernatant.

## 4.2.2.1 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

### 4.2.2.1.1 IZOLACIJA RNK

Za izolaciju RNK je korišćen komercijalni kit QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, Nemačka). Postupak izolacije RNK je izveden na sobnoj temperaturi prema uputstvu proizvođača.

Oprema koja je korišćena za izolaciju RNK je navedena u tabeli 7.

Tabela 7: Spisak opreme koja je korišćena za izolaciju RNK

NAZIV OPREME	TIP	PROIZVOĐAČ	SERIJSKI BROJ
Mikrocentrifuga	TYP 2004	HETTICH	0010301-01-00
Biohazard kabinet klase II	VBH36C2 Cabinet	ALS	LS00535

Koncentrovani puferi AW1 i AW2 su prethodno pripremljeni dodavanjem odgovarajuće zapremine 96-100 % etanola. Nosač RNK (carrier RNA) je pripremljen rastvaranjem 310 µg liofilizovanog nosača u 310 µl pufera AVE.

Postupak izolacije RNK:

- Sipati 560 µl pripremljenog lizirajućeg pufera u mikrotube od 1,5 ml.
- Dodati 140 µl uzorka i izmešati sadržaj tokom 15 s.
- Inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi.
- Nakon kratkog centrifugiranja da bi se uklonile kapljice sa poklopaca i sprečila kontaminacija, dodati 560 µl 96-100% etanola i izmešati tokom 15 s.
- Pažljivo sipati 630 µl mešavine pripremljene u koraku 5 u QIAamp Mini kolone (postavljene u 2 ml sabirne mikrotube). Centrifugirati na 6000 g tokom 1 min. Odbaciti filtrat i postaviti QIAamp Mini kolone u nove sabirne mikrotube.
- Pažljivo otvoriti kolonu i ponoviti korak 6.
- Pažljivo otvoriti mikrotube i dodati 500 µl pufera AW1. Centrifugirati na 6000 g 1 min. Odbaciti filtrat i postaviti QIAamp Mini kolonu u novu sabirnu mikrotubu.

- Pažljivo otvoriti kolonu i dodati 500 µl pufera AW2. Centrifugirati na 20000 g 3 min.
- Odbaciti filtrat i postaviti QIAamp Mini kolonu u novu sabirnu mikrotubu. Centrifugirati 1 min na 20000 g.
- Postaviti kolonu u 1,5 ml mikrotubu. Sipati 60 µl pufera AVE, zatvoriti tube i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi. Zatim centrifugirati tokom 1 min na 6000 g. Izolovanu RNK čuvati na -80 °C do dalje upotrebe u RT-PCR testu.

#### 4.2.2.1.2 IZOLACIJA DNK

Izolacija DNK je izvedena upotrebom komercijanog kita QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Nemačka).

Oprema koja je korišćena za izolaciju DNK je navedena u tabeli 8.

Tabela 8: Spisak opreme koja je korišćena za izolaciju DNK

NAZIV OPREME	TIP	PROIZVOĐAČ	SERIJSKI BROJ
Mikrocentrifuga	TYP 2004	HETTICH	0010301-01-00
Termoblok	QBD1	Grant	J11208003
Biohazard kabinet klase II	VBH36C2 Cabinet	ALS	LS00535

Puferi AW1 i AW2 su pripremljeni prema instrukcijama proizvođača, dodavanjem određene zapremine 96-100% etanola u koncentrovane pufere.

Postupak izolacije DNK:

- Sipati 20 µl proteinaze K na dno mikrotube od 1,5 ml.
- Dodati 200 µl uzorka.
- Dodati 200 µl pufera AL i izmešati sadržaj tokom 15 s.
- Inkubirati na 56 °C tokom 10 min.
- Kratko centrifugirati kako bi se uklonile kapljice sa poklopca mikrotube.

- Dodati 200 µl etanola (96–100%). Izmešati sadržaj tokom 15 s. Kratko centrifugirati mikrotube da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca.
- Mešavinu iz prethodnog koraka pažljivo sipati u QIAamp Mini kolonu. Centrifugirati na 6000 g tokom 1 min. Postaviti kolonu u novu sabirnu mikrotubu, a staru i filtrat baciti.
- Dodati 500 µl pufera AW1 i centrifugirati na 6000 g tokom 1 min. Postaviti kolonu u novu sabirnu mikrotubu, a staru i filtrat baciti.
- Dodati 500 µl pufera AW2 i centrifugirati na 20000 g tokom 3 min.
- Postaviti kolonice u 1,5 ml mikrotube. Sabirne tubice i filtrat baciti. Dodati 200 µl pufera AE ili destilovane vode i inkubirati na sobnoj temperaturi 1 min. Centrifugirati na 6000 g tokom 1 min. Izolovana DNK je sakupljena u 1,5 ml mikrotubama i čuva se na -80 °C do dalje upotrebe u PCR testu.

#### 4.2.2.2 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Za umnožavanje i dokazivanje delova genoma specifičnih za ispitujuće viruse, korišćene su gotove, komercijalne reakcione smeše i prajmeri (tabela 9).

Tabela 9: Spisak prajmera i delova i dužine genoma za koji su specifični

Virus	Prajmeri	Dužina PCR proizvoda (bp)	Region
<b>ADV</b> <b>[148, 43]</b>	F: MA1 – GCCAGCCGTACACGCAG R: MA2 – CCGTAGCAGAGGCTCCCG	294	gG (us4)
	F: GAGAAACCGGAAGTGACGAA R: GGGGCCCATTTATTGTGAC	550	us9
	F: CCCAGGGGAACCTTATAAAATC R: TTTCTCGAGCTGGACATGG	447	ul49,5
<b>TGEV</b> <b>[149]</b>	F: T1 - GTGGTTTTGGTYRTAAATGC R: T2 - CACTAACCAACGTGGARCTA	859	S gen

<b>PRRS [150]</b>	F: P1 5 - CCAGCCAGTCAATCARCTGTG R: P2 5 - GCGAATCAGGCGCACWGTATG	637	ORF 7
<b>PCV2 [151]</b>	F: PCV2 1 - CGGATATTGTAGTCCTGGTTCG R: PCV2 2 - ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA	481	ORF 2
<b>SIV [152]</b>	F: InfA F - GACCRATCCTGTCACCTCTGAC R: InfA R - AGGGCATTYTTGGACAAAKCGTCTA P: InfA P - TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	-	Matriks protein
<b>PPV [151]</b>	F: PPV1 - CCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCAC R: PPV2 - GTCCATGTTGGTAATCCATTGTAAATC	226	ORF 2

Reverzna transkripcija-lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) je korišćena za dokazivanje RNK virusa, virus PRRS-a i TGEV (OneStep RT-PCR Kit: QIAGEN, Nemačka). Za dokazivanje virusa influence, takođe je korišćen RT-PCR test (TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit: Applied Biosystems, SAD) ali u realnom vremenu (RT-qPCR).

Za dokazivanje genoma DNK virusa, virus Aujeckijeve bolesti, PPV i PCV2, korišćen je PCR test (HotStarTaq Master Mix Kit: Qiagen, Nemačka).

Oprema koja je korišćena za molekularnu dijagnostiku je navedena u tabeli 10.

Tabela 10: Spisak opreme koja je korišćena za PCR

<b>NAZIV OPREME</b>	<b>TIP</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>	<b>SERIJSKI BROJ</b>
PCR kabinet	GP Flow Plus PCR	Aqaria	283/11
Real Time PCR sistem	7300	Applied Biosystems	273001696
Strujni izvor za elektroforezu	EPS301	Amersham Pharmacia Biotech	01040168
Kada za elektroforezu	HE33	Hoefler	-
Termalni procesor za PCR	96	Eppendorf	5333-41055
Transiluminator	Tcp-20-m	Vilber Lourmat	M032307
Gel dokumentacioni sistem	GelDoc-It	UVP	A 031312-001

4.2.2.2.1 REVERZNA TRANSKRIPCIJA – LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (RT-PCR)  
ZASNOVANA NA GEL ELEKTROFOREZI

Reakciona smeša je pripremljena na ledu prema tabeli 11.

Tabela 11: Priprema reakcione smeše za RT-PCR

Reagens	Zapremina (µl)/uzorak
Voda	6
5X One step RT-PCR buffer	4
dNTP mix	0,8
5XQ Solution	4
Prajmer F	1,2
Prajmer R	1,2
ONESTEP RT-PCR enzyme mix	0,8
<b>UKUPNO</b>	<b>18</b>

Nakon pripreme, reakcionoj smeši je dodato 2 µl izolovane RNK. Uzorci su postavljeni u termalni procesor prethodno ugrijan na 50 °C. Temperaturni profili su dati u tabeli 12.

Tabela 12: Temperaturni profil RT-PCR reakcije za TGEV i virus PRRS-a

	TGE		PRRS	
Reverzna transkripcija	30 min, 50 °C			
Aktivacija polimeraze	95 °C 15 min			
Denaturacija DNK	30x	94 °C, 30 s	55x	95 °C, 20 s
Vezivanje prajmera		53 °C, 60 s		55 °C, 20 s
Izduživanje lanca DNK		72 °C, 60 s		72 °C, 20 s
Izduživanje lanca DNK	72 °C, 5 min			
Čuvanje proizvoda reakcije do analize na gelu	4 °C, ∞			

#### 4.2.2.2 REVERZNA TRANSKRIPCIJA – LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE U REALNOM VREMENU (RT-qPCR)

Reakciona smeša je pripremljena prema tabeli 13.

Tabela 13: Priprema reakcione smeše za RT-qPCR

Reagens	Zapremina (µl)/uzorak
Voda	6
2X Master Mix without UNG	10
40X Multiscribe and Rnase inhibitor Mix	0,5
Prajmer F	0,5
Prajmer R	0,5
TaqMan proba	0,5
<b>UKUPNO</b>	<b>18</b>

Reakcionoj smeši koja se priprema na ledu je dodato 2 µl izolovane RNK. Reakcija se odvija prema temperaturnom profilu datom u tabeli 14.

Tabela 14: Temperaturni profil RT-qPCR reakcije za influencu A

		SIV
Reverzna transkripcija		48 °C, 30 min
Aktivacija polimeraze		95 °C, 10 min
Denaturacija DNK		95 °C, 15 s
Vezivanje prajmera i izduživanje lanca DNK	50x	60 °C, 1 min

#### 4.2.2.3 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR) ZASNOVANA NA GEL ELEKTROFOREZI

Priprema reakcione smeše za jedan uzorak data je u tabeli 15.

Tabela 15: Priprema reakcione smeše za PCR

Reagens	Zapremina (µl)/uzorak
HotStart Q Master Mix	25
Prajmer F	2
Prajmer R	2
Voda	16
<b>UKUPNO</b>	<b>45</b>



Reakcionoj smeši je dodato 5  $\mu$ l izolovane DNK. Reakcija se odvija prema temperaturnom profilu datom u tabeli 16.

Tabela 16: Temperaturni profil PCR reakcije za PPV, PCV2 i PRV

	PPV&PCV2		PRV - gC (us4)		PRV - us9, ul49,5	
Aktivacija polimeraze	95 °C 15 min					
Denaturacija DNK		94 °C, 30 s		95 °C, 60 s		95 °C, 50 s
Vezivanje prajmera	35x	53 °C, 60 s	35x	60 °C, 45 s	35x	57 °C, 50 s
Izduživanje DNK lanca		72 °C, 60 s		72 °C, 60 s		72 °C, 50 s
Izduživanje DNK lanca	72 °C, 5 min					
Čuvanje proizvoda reakcije do analize na gelu	4 °C, $\infty$					

#### 4.2.2.3 GEL ELEKTROFOREZA

Po završetku RT-PCR i PCR, proizvodi reakcija su analizirani gel elektroforezom. U te svrhe je korišćen 2% agarozni gel sa etidijum bromidom u TBE puferu. Za određivanje dužine PCR proizvoda, prilikom svake elektroforeze postavljen je i molekularni marker kao mešavina fragmenata DNK različitih dužina (GeneRuler 100 bp DNA Ladder: Thermo Fisher Scientific Inc. SAD). Elektroforeza je izvedena pri jačini struje od 60 mA, naponu od 120 V, u trajanju od 1 h.

#### 4.2.2.4 PREČIŠĆAVANJE PCR PROIZVODA

Prečišćavanje PCR proizvoda je neophodan korak pre sekvenciranja da bi se sve neutrošene komponente i nespecifični fragmenti male dužine uklonili iz samog PCR proizvoda.

Za prečišćavanje je korišćen QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka). Pre izvođenja samog postupka prečišćavanja, 96-100% etanol je dodat u PE pufer. Za sve potrebne postupke centrifugiranja korišćena je brzina od 20000 g.

Postupak prečišćavanja PCR proizvoda:

- Na jedan deo PCR proizvoda, dodati 5 delova pufera PB i izmešati sadržaj.
- Pripremljeni PCR proizvod iz koraka 1 sipati u QIAquick kolonu.
- Centrifugirati 30-60 s. Filtrat baciti.
- Za ispiranje DNK, dodati 0,75 ml pufera PE i centrifugirati 30-60 s. Filtrat baciti.
- Praznu QIAquick kolonu centrifugirati još jednom tokom 1 min.
- Staviti QIAquick kolonu u 1,5 ml mikrotubu.
- Za otpuštanje DNK sa membrane, dodati 50 µl pufera EB na centar membrane i centrifugirati 1 min.

#### **4.2.2.5 SEKVENCIRANJE**

Prečišćeni PCR proizvodi su sekvencirani u MacroGen Europe (Amsterdam, Holandija).

#### **4.2.2.6 FILOGENETSKA ANALIZA**

Filogenetska analiza je izvršena upotrebom MEGA software version 6, Basic Local Alignment Searching Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i sekvenci virusa Aujeckijeve bolesti koje su dostupne u banci gena (NCBI).

### **4.2.3 METODE ZA DOKAZIVANJE VIRUSA/VIRUSNIH ANTIGENA**

#### **4.2.3.1 IZOLACIJA VIRUSA I ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI ĆELIJSKIH LINIJA**

Izolacija virusa [147] je izvršena iz uzoraka organa u kojima je prethodno molekularnim tehnikama utvrđeno prisustvo genoma virusa Aujeckijeve bolesti.

Oprema koja je korišćena za izolaciju virusa je navedena u tabeli 17<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Navedena oprema je korišćena i za test neutralizacije virusa specifičnim antitelima i imunofluorescenciju

Tabela 17: Spisak opreme koja je korišćena za izolaciju virusa

<b>NAZIV OPREME</b>	<b>TIP</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>	<b>SERIJSKI</b>
Biohazard kabinet klase II	VBH48C2	WHB steril	16706
CO2 inkubator	CO170R-230-1000	NewBrunswick	36378
Univerzalna centrifuga sa	351R	MPW	10241R020
Biohazard kabinet klase II	VE180 PLUS	Aqaria	006/11
CO2 inkubator	-	Binder	CB150#034
Invertni svetlosni mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss	383200134
Biohazard kabinet klase II	VE90 PLUS	Aqaria	001/11
Fluorescentni mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss	383200196
Termostat	H11420BD	Termal	-

#### 4.2.3.1.1 Priprema uzoraka za izolaciju virusa

Uzorak organa veličine 1 cm<sup>3</sup> je homogenizovan u tarioniku sa 9 ml medijuma za ćelijsku kulturu (MEM: Gibco BRL, SAD) kojoj su dodati antibiotici. Na ovaj način je napravljena 10% suspenzija organa. Pošto su stajali 1h na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 min na 900 g. Za inokulaciju je korišćen supernatant koji se izdvojio nakon centrifugiranja. Da bi se izbegla citotoksičnost uzorka za ćelijske linije, supernatant je razblažen 1:10 i 1:100 čime su razblažene i citotoksične materije u uzorku. Koncentrovan uzorak i oba razblaženja su inokulisana u prijemčive ćelijske linije, PK15, MDBK i RK13. Sterilizacija uzorka pre inokulacije je izvedena filtriranjem kroz filter promera pora 0,45 µm (Merck Millipore Corporation, Nemačka).

#### 4.2.3.1.2 Izvođenje izolacije virusa

Za izolaciju virusa su korišćene 24 bunarske ploče (Sarstedt, Nemačka) u koje je dodato 0,5 ml sveže pripremljenih ćelija u 10% MEM-u. Nakon 24 h, pošto su ćelije formirale 80-100% konfluentni monosloj, inokulisano je 200 µl pripremljenih uzoraka u duplikatu.

Ploče su inkubirane 2h na 37 °C da bi se omogućilo vezivanje virusa za ćelije nakon čega su ćelije isprane PBS-om. Dodato je 0,5 ml sveže hranljive podloge sa 2% fetalnog telećeg seruma (FBS: Gibco BRL, SAD).

Ploče su inkubirane na 37 °C sa 5% CO<sub>2</sub> i posmatrane svakodnevno na pojavu CPE. Ploče u kojima ni nakon 6 dana nije došlo do razvoja CPE su zamrznute na -80 °C i odmrznute. Ovaj postupak je ponavljan 3 puta. Odmrznut sadržaj bunara je centrifugiran 10 min na 900 g, a supernatant korišćen za drugu pasažu.

#### **4.2.3.2 IDENTIFIKACIJA VIRUSA**

Izolovani virusi su identifikovani neutralizacionim testom, imunofluorescencijom i histološkim bojenjem hematoksilin eozinom.

##### *4.2.3.2.1 TEST NEUTRALIZACIJE VIRUSA SPECIFIČNIM ANTITELIMA*

Za neutralizaciju izolovanih virusa korišćen je supernatant iz bunara u kojima je došlo do pojave CPE [147]. Supernatant kome su u istoj zapremini dodati specifični antiserumi, S1-S3, je inkubiran na 37 °C tokom 1 h nakon čega je inokulisan na ćelijske linije. Odsustvo CPE nakon inkubacije od 72 h na 37 °C je potvrda identiteta virusa.

##### *4.2.3.2.2 IMUNOFLUORESCENCIJA*

Virus Aujeckijeve bolesti je identifikovan primenom specifičnih antitela konjugovanih sa fluorescein izotiocijanatom (FITC) koja su nanošena u bunare u kojima je došlo do pojave CPE [147].

Za potrebe imunofluorescencije, ćelije su fiksirane mešavinom aceton-etanolu u odnosu 1:1 tokom 10 min na sobnoj temperaturi.

Detekcija virusa je izvršena dodavanjem 100 µl FITC monoklonskih antitela (FITC anti-Pseudorabies (Aujeszky) SuHV-1, BIO 265, Bio X, Belgium). Nakon inkubacije od 60 min na 37 °C u vlažnoj komori i ispiranja PBS-om i vodom, ćelije su posmatrane pod UV mikroskopom. Nalaz tačkastih fluorescirajućih polja su potvrda odnosno identifikacija virusa Aujeckijeve bolesti.

##### *4.2.3.2.3 HISTOLOŠKE METODE*

Bojenje hematoksilin eozinom je histološka tehnika, ali zbog karakteristika Herpesvirusa da stvaraju acidofilne intranuklearne inkluzije sa marginacijom hromatina, korišćena je kao metoda za identifikaciju herpesvirusa u kulturi tkiva.

#### 4.2.3.1.3.1 BOJENJE HEMATOKSILIN EOZINOM

Primenjeno bojenje hematoksilin eozinom je, s obzirom da ćelijske linije rastu na plastičnoj podlozi, modifikovano u odnosu na metodu (DMM077<sup>5</sup>) koja se koristi u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije u koracima u kojima se koristi ksilol jer ovaj reagens razlaže plastiku. Postupak bojenja izvodi se inkubiranjem ćelijske kulture sa reagensima redosledom datim u tabeli 18.

Tabela 18: Postupak bojenja ćelijske kulture hematoksilin eozinom

<b>REAGENS</b>	<b>VREME INKUBACIJE</b>
100% etanol	1 min
100% etanol	1 min
96% etanol	1 min
96% etanol	1 min
Voda	5 s
Hematoksilin	5 min
Voda	5 s
Kiseli alkohol	5 s
Voda	5 s
Litijum karbonat	1 min
96% etanol	2 min
Eozin	5 min
96% etanol	1 min
96% etanol	1 min
100%etanol	1 min

---

<sup>5</sup> Bojenje histoloških preparata hematoksilin eozin (HE) metodom

#### 4.2.4 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Pouzdanost od 95% (CI) za standardne greške (SE) je izračunata prema obrascu:

$$se_{95\% CI} = 1.96(p[1-p])/n^{1/2}.$$

Za testiranje značajnosti razlika u rezultatima između polova i starosnih kategorija korišćen je Hi kvadrat test ( $\chi^2$ ) za dve i više proporcija, uz grešku od 5%.

Za izračunavanje statističkih parametara je korišćen Social Science Statistics website<sup>6</sup>.

Survey Toolbox Version 1.0 beta softver je korišćen za izračunavanje prevalencije i demonstraciju odsustva bolesti.

#### 4.2.5 ANALIZA RIZIKA I GEOGRAFSKO POZICIONIRANJE

Analiza rezultata u odnosu na utvrđenu vremensku i prostornu distribuciju bolesti kod divljih svinja i gustinu i lokaciju domaćih svinja izvršena je upotrebom softvera Quantum GIS 2.8.1 Wiena, ArcGIS i sistema za globalno pozicioniranje (global positioning system (GPS) - google earth software (<http://earth.google.com/>)). Na osnovnu administrativnu mapu Srbije u formatu .shp, dodati su slojevi pripremljeni u .csv formatu za gustinu populacije domaćih svinja, gustinu populacije divljih svinja, seroprevalenciju Aujeckijeve bolesti, PPV infekcije i PCV2 infekcije. Koristeći administrativnu podelu, na osnovu brojčanih vrednosti gustine i seroprevalencije, izvršena je kategorizacija okruga što je predstavljeno različitim intenzitetom boje.

GPS koordinate za svaki pozitivan uzorak projektovane su u .kml vektorski sloj koji je dodat na slojeve kojima se prikazuje gustina i seroprevalencija ispitujućih bolesti.

Korelacija pojave zarazne bolesti i gustine populacije divljih i domaćih svinja je izvršena upotrebom Pirsonovog koeficijenta korelacije<sup>3</sup>.

Analiza rizika od širenja zaraznih bolesti kod divljih svinja i prenošenja bolesti na domaće svinje izvršena je kvalitativnom metodom koju je osmislio Zepeda Sein [153].

---

<sup>6</sup> <http://www.socscistatistics.com/pvalues/normaldistribution.aspx>

Kao faktori rizika prepoznati su način prenošenja zarazne bolesti, prevalencija bolesti kod domaćih i divljih svinja, gustina i način držanja domaćih svinja, gustina divljih svinja i sezonalnost/ponašanje divljih svinja, a sam rizik je posmatran u funkciji verovatnoće od nastanka infekcije i značaja njenih posledica.

Za analizu rizika je korišćena deskriptivna skala:

- Zanemarljiv (Z) – kada je verovatnoća rizika toliko niska da se može ignorisati ili se dešava u izuzetnim situacijama,
- Nizak (N) – kada je verovatnoća rizika moguća samo u pojedinačnim slučajevima,
- Srednji (S) - kada je verovatnoća rizika moguća i
- Visok (V) - kada je verovatnoća rizika vrlo moguća.

Procena je izvršena prema obrascu datom u tabeli 19.

Tabela 19: Kombinacije verovatnoće za dva parametra koje su korišćene u kvalitativnoj analizi rizika [155]

Parametar 2	Parametar 1			
	Zanemarljiv	Nizak	Srednji	Visok
Zanemarljiv	Z	N	N	S
Nizak	N	N	S	S
Srednji	N	S	S	V
Visok	S	S	V	V

Za analizu rizika su korišćeni podaci o broju divljih i domaćih svinja izraženi po km<sup>2</sup> za svaki okrug, tabela 20.

Tabela 20: Gustina domaćih i divlji svinja po okrugu

<b>OKRUG</b>	<b>GUSTINA DIVLJIH SVINJA/km<sup>2</sup>(7)</b>	<b>GUSTINA DOMAĆIH SVINJA km<sup>2</sup>(8)</b>
	0,15	70,03
<b>Borski</b>	0,32	8,55
<b>Braničevski</b>	0,29	52,78
<b>Moravički</b>	0,17	27,52
<b>Pomoravski</b>	0,29	52,03
<b>Rasinski</b>	0,26	120,36
<b>Raški</b>	0,27	11,23
<b>Šumadijski</b>	0,08	42,31
<b>Zaječarski</b>	0,43	20,98
<b>Zlatiborski</b>	0,20	7,82

<sup>7</sup> Podaci o broju domaćih svinja su preuzeti iz Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine

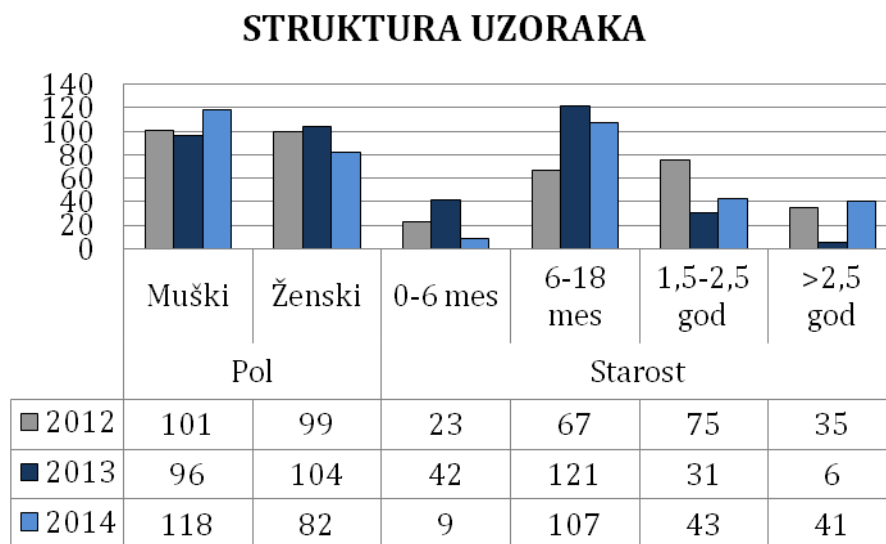
<sup>8</sup> Podaci o broju domaćih svinja su preuzeti iz Republičkog zavoda za statistiku



## 5. REZULTATI

### 5.1. REZULTATI ISPITIVANJA PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA U KRVNIM SERUMIMA DIVLJIH SVINJA U PERIODU 2012 – 2014. GODINE

Ispitivanjem je obuhvaćeno 600 krvnih seruma divljih svinja izlovljenih tokom perioda 2012-2014. godine, različitih starosnih kategorija i polova (slika 14). Uzorci su grupisani i rezultati predstavljeni prema polu, starosnim kategorijama i vremenskoj i geografskoj distribuciji.



Slika 14: Struktura pregledanih uzoraka prema polu, starosti i godini uzorkovanja

### 5.1.1. *ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV VIRUSA PRRS-A*

Ispitivanjem 600 krvnih seruma koji su uzorkovani tokom perioda 2012-2014. nije dokazana serokonverzija ni kod jedne od ispitanih divljih svinja.

Korišćenjem softverskog paketa Survey Toolbox i podataka o osetljivosti (82,5%) i specifičnosti (97%) ELISA testa, sa sigurnošću od 99,956% se može tvrditi da je PRRS odsutan kod divljih svinja, odnosno da je prevalencija niža od 1%.

### 5.1.2. *ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV VIRUSA AUJECKIJEVE BOLESTI*

Za ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti korišćen je virus neutralizacioni test. Titar antitela 1:4 i viši je smatran pozitivnim nalazom. Za svaku ispitujuću godinu je pregledano po 200 krvnih seruma, a rezultati su predstavljeni u tabeli 21. Utvrđeno je da je za poslednje 2 godine prevalencija porasla sa 56% u 2012. godini na 72% u 2013. odnosno 70% u 2014. godini.

Prevalencija kod različitih polova i starosnih kategorija je različita. Kod mužjaka (n=238, 76%) prevalencija je veća nego kod ženki (n=156, 55%) što predstavlja statistički značajnu razliku ( $p=0,005$ ,  $p<0,05$ ). Razlika u prevalenciji je statistički značajna i kod različitih starosnih kategorija ( $p=0$ ,  $p<0,05$ ) i bila je viša kod kategorija divljih svinja starijih od 1,5 godine u odnosu na mlađe kategorije, 0-6 meseci i 6-18 meseci starosti.

Razlike u prevalenciji su uočljive i na nivou okruga gde se kreće od 16% u zlatiborskom okrugu u 2013. godini do 90% u šumadijskom okrugu u 2014. godini, tabela 22.

Tabela 21: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti

Godina	Prev. (%, CI 95%)	POL		STAROST			
		Muški (%, CI 95%)	Ženski (%, CI 95%)	0-6 meseci (%, CI 95%)	6-18 meseci (%, CI 95%)	1,5-2,5 godine (%, CI 95%)	>2,5 godine (%, CI 95%)
<b>2014</b>	139/200 (70, ±6,35)	79/118 (67, ±8,48)	60/82 (73, ±9,61)	7/9 (78, ±27,06)	87/107 (81, ±7,43)	29/43 (67, ±14,05)	27/41 (66, ±14,5)
<b>2013</b>	144/200 (72, ±6,22)	78/96 (81, ±7,85)	66/104 (63, ±9,28)	20/42 (48, ±15,11)	42/121 (35, ±8,5)	25/31 (81, ±13,81)	5/6 (83, ±30,06)
<b>2012</b>	111/200 (56, ±6,88)	81/101 (80, ±7,8)	30/99 (30, ±9,03)	13/23 (56, ±11,02)	55/67 (82, ±9,2)	53/75 (71, ±10,27)	31/35 (89, ±10,37)
<b>UKUPNO</b>		238/315 (76, ±4,78)	156/285 (55, ±5,78)	40/74 (54, ±11,36)	184/295 (62, ±5,54)	107/149 (72, ±7,21)	63/82 (77, ±9,11)

Tabela 22: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti po okruzima

Okrug	Godina	Ukupno (%, CI 95%)	Pol		Starost			
			Muški (%)	Ženski (%)	0-6 meseci (%)	6-18 meseci (%)	1,5-2,5 godine(%)	>2,5 godine (%)
Beogradski	2014	3/5 (60, ±42,94)	2/3 (67)	1/3 (33)	0/3 (0)	0/3 (0)	1/3 (67)	2/3 (67)
	2013	4/5 (80, ±35,06)	1/4 (25)	3/4 (75)	0/4 (0)	3/4 (75)	0/4 (0)	1/4 (25)
	2012	1/5 (20, ±35,06)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)
Borski	2014	23/30 (77, ±16,83)	10/23 (43)	13/23 (57)	1/23 (4)	17/23 (74)	2/23 (9)	3/23 (13)
	2013	20/30 (67, ±15,06)	11/20 (55)	9/20 (45)	2/20 (10)	8/20 (40)	9/20 (45)	1/20 (5)
	2012	21/30 (70, ±16,4)	8/21 (38)	13/21 (62)	3/21 (14)	6/21 (29)	7/21 (33)	5/21 (24)
Braničevski	2014	22/25 (88, ±12,74)	12/22 (55)	10/22 (45)	0/22 (0)	14/22 (63)	5/22 (23)	3/22 (14)
	2013	22/25 (88, ±12,74)	11/22 (50)	11/22 (50)	1/22 (5)	10/22 (45)	9/22 (41)	2/22 (9)
	2012	18/25 (72, ±17,6)	10/18 (56)	8/18 (44)	3/18 (17)	6/18 (33)	8/18 (44)	1/18 (6)
Moravički	2014	5/10 (50, ±30,94)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	1/5 (20)	1/5 (20)	3/5 (60)
	2013	2/10 (20, ±24,79)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)
	2012	3/10 (30, ±28,4)	2/3 (75)	1/3 (25)	1/3 (25)	2/3 (75)	0/3 (0)	0/3 (0)
Pomoravski	2014	17/25 (68, ±18,29)	10/17 (59)	7/17 (41)	1/17 (6)	10/17 (59)	4/17 (23)	2/17 (12)
	2013	19/25 (76, ±16,74)	8/19 (42)	11/19 (58)	3/19 (16)	4/19 (21)	7/19 (37)	5/19 (26)
	2012	15/25 (60, ±19,2)	8/15 (53)	7/15 (47)	0/15 (0)	10/15 (67)	5/15 (33)	0/15 (0)
Rasinski	2014	13/20 (65, ±20,09)	7/13 (54)	6/13(46)	0/13 (0)	6/13 (46)	6/13 (46)	1/13 (8)
	2013	13/20 (65, ±20,09)	5/13 (38)	8/13 (62)	1/13 (8)	5/13 (38)	2/13 (16)	5/13 (38)

	2012	16/20 (80, ±17,53)	8/16 (50)	8/16 (50)	1/16 (6)	4/16 (25)	4/16 (25)	7/16 (44)
<b>Raški</b>	2014	14/20 (70, ±20,08)	8/14 (57)	6/14 (43)	1/14 (7)	8/14 (57)	4/14 (29)	1/14 (7)
	2013	16/20 (80, ±17,53)	8/16 (50)	8/16 (50)	3/16 (19)	4/16 (25)	5/16 (31)	4/16 (25)
	2012	16/20 (80, ±17,53)	5/16 (31)	11/16 (69)	4/16 (25)	7/16 (44)	5/16 (31)	0/16 (0)
	2014	9/10 (90, ±18,59)	5/9 (55)	4/9 (45)	1/9 (11)	5/9 (55)	2/9 (23)	1/9 (11)
<b>Šumadijski</b>	2013	3/10 (30, ±28,4)	0/3 (0)	3/3 (100)	0/3 (0)	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)
	2012	4/10 (40, ±30,36)	1/4 (25)	3/4 (75)	0/4 (0)	3/4 (75)	0/4 (0)	1/4 (25)
	2014	23/30 (77, ±15,06)	15/23 (65)	8/23 (35)	3/23 (13)	17/23 (74)	0/23 (0)	3/23 (13)
<b>Zaječarski</b>	2013	25/30 (83, ±13,44)	12/25 (48)	13/25 (52)	3/25 (12)	10/25 (40)	6/25 (24)	6/25 (24)
	2012	26/30 (87, ±12,03)	12/26 (60)	14/26 (40)	6/26 (23)	16/26 (62)	4/26 (15)	0/26 (0)
	2014	10/25 (40, ±19,2)	5/10 (50)	5/10 (50)	2/10 (20)	1/10 (10)	4/10 (40)	3/10 (30)
<b>Zlatiborski</b>	2013	4/25 (16, ±14,37)	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	1/4 (25)	3/4 (75)	0/4 (0)
	2012	7/25 (28, ±17,6)	5/7 (71)	2/7 (29)	0/7 (0)	2/7 (29)	3/7 (42)	2/7 (29)

### 5.1.3. *ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV PARVOVIRUSA SVINJA*

Prevalencija PPV infekcije kod divljih svinja prema rezultatima testa heminhibicije za poslednje tri godine je stabilna i kreće se oko 50%, tabela 23.

Razlike u seroprevalenciji kod polova i starosnih kategorija se ne mogu smatrati značajnim ( $p > 0,05$ ).

Na nivou okruga i na osnovu trogodišnjeg ispitivanja, uočava se ujednačenost prisustva PPV infekcije kod divljih svinja, sa nešto nižom prevalencijom u zlatiborskom okrugu, tabela 24.

Tabela 23: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv PPV

Godina	Prev (%, CI 95%)	POL		STAROST			
		Muški (%, CI 95%)	Ženski (%, CI 95%)	0-6 meseci (%, CI 95%)	6-18 meseci (%, CI 95%)	1,5-2,5 godine (%, CI 95%)	>2,5 godine (%, CI 95%)
<b>2014</b>	106/200 (53, ±6,92)	62/118 (52, ±9,01)	44/82 (54, ±10,79)	5/9 (56, ±7,5)	43/107 (40, ±9,28)	25/43 (58, ±14,75)	23/41 (56, ±15,19)
<b>2013</b>	87/200 (44, ±6,88)	43/96 (45, ±9,95)	44/104 (42, ±9,49)	21/42 (50, ±15,12)	50/121 (41, ±8,76)	11/31 (35, ±16,79)	5/6 (83, ±30,06)
<b>2012</b>	90/200 (45, ±6,89)	48/101 (48, ±9,74)	42/99 (42, ±9,72)	8/23 (35, ±19,49)	54/67 (81, ±9,39)	21/75 (28, ±10,16)	7/35 (20, ±13,25)
<b>UKUPNO</b>		153/315 (49, ±5,52)	130/285 (46, ±5,79)	34/74 (46, ±11,36)	147/295 (50, ±5,71)	57/149 (38, ±7,79)	35/82 (43, ±10,72)

Tabela 24: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv PPV po okruzima

Okrug	Godina	Ukupno (%, CI 95%)	POL		STAROST			
			Muški (%)	Ženski (%)	0-6 meseci (%)	6-18 meseci (%)	1,5-2,5 godine(%)	>2,5 godine (%)
Beogradski	2014	5/5 (100, ±0)	2/5 (40)	3/5 (60)	0/5 (0)	0/5 (0)	3/5 (60)	2/5 (40)
	2013	5/5 (100, ±0)	1/5 (20)	4/5 (80)	1/5 (20)	1/5 (20)	2/5 (60)	0/5 (0)
	2012	5/5 (100, ±0)	2/5 (40)	3/5 (60)	0/5 (0)	2/5 (40)	3/5 (60)	0/5 (0)
Borski	2014	18/30 (60, ±17,53)	11/18 (61)	7/18 (39)	0/18 (0)	11/18 (61)	3/18 (17)	4/18 (22)
	2013	21/30 (70, ±16,4)	11/21 (52)	10/21 (48)	8/21 (38)	12/21 (57)	1/21 (5)	0/21 (0)
	2012	20/30 (67, ±16,83)	10/20 (50)	10/20 (50)	2/20 (10)	12/20 (60)	6/20 (30)	0/20 (0)
Braničevski	2014	17/25 (68, ±18,29)	10/17 (59)	7/17 (41)	0/17 (0)	11/17 (64)	3/17 (18)	3/17 (18)
	2013	10/25 (40, ±19,2)	3/10 (30)	7/10 (70)	1/10 (10)	8/10 (80)	0/10 (0)	1/10 (10)
	2012	11/25 (44, ±19,46)	6/11 (55)	5/11 (45)	0/11 (0)	10/11 (91)	1/11 (9)	0/11 (0)
Moravički	2014	7/10 (70, ±28,4)	4/7 (57)	3/7 (43)	0/7 (0)	1/7 (14)	1/7 (14)	5/7 (72)
	2013	5/10 (50, ±30,99)	4/5 (80)	1/5 (20)	0/5 (0)	3/5 (60)	1/5 (20)	1/5 (20)
	2012	8/10 (80, ±24,79)	4/8 (50)	4/8 (50)	2/8 (25)	6/8 (75)	0/8 (0)	0/8 (0)
Pomoravski	2014	12/25 (48, ±19,58)	6/12 (50)	6/12 (50)	1/12 (9)	4/12 (33)	3/12 (25)	4/12 (33)
	2013	15/25 (60, ±19,2)	6/15 (40)	9/15 (60)	3/15 (20)	10/15 (67)	0/15 (0)	2/15 (13)
	2012	13/25 (52, ±19,58)	9/13 (70)	4/13 (30)	1/13 (8)	7/13 (54)	3/13 (23)	2/13 (15)
Rasinski	2014	13/20 (65, ±20,9)	6/13 (46)	7/13 (54)	1/13 (8)	4/13 (31)	5/13 (38)	3/13 (23)
	2013	8/20 (40, ±21,47)	4/8 (50)	4/8 (50)	0/8 (0)	7/8 (88)	0/8 (0)	1/8 (12)
	2012	8/20 (40, ±21,47)	2/8 (25)	6/8 (75)	1/8 (12)	4/8 (50)	3/8 (38)	0/8 (0)
Raški	2014	8/20 (40, ±21,47)	2/8 (25)	6/8 (75)	1/8 (12)	5/8 (63)	2/8 (25)	0/8 (0)
	2013	6/20 (30, ±20,08)	4/6 (67)	2/6 (33)	0/6 (0)	0/6 (0)	6/6 (100)	0/6 (0)
	2012	9/20 (45, ±21,8)	6/9 (67)	3/9 (33)	2/9 (22)	6/9 (67)	0/9 (0)	1/9 (11)
Šumadijski	2014	4/10 (40, ±30,36)	2/4 (50)	2/4 (50)	0/4 (0)	1/4 (25)	2/4 (50)	1/4 (25)



	2013	1/10 (10, ±18,59)	0/1 (0)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
	2012	2/10 (20, ±24,79)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
<b>Zaječarski</b>	2014	9/30 (30, ±16,4)	6/9 (67)	3/9 (33)	1/9 (11)	6/9 (67)	0/9 (0)	2/9 (22)
	2013	12/30 (40, ±17,53)	9/12 (75)	3/12 (25)	7/12 (58)	4/12 (33)	1/12 (8)	0/12 (0)
	2012	13/30 (43, ±17,72)	8/13 (61)	5/13 (39)	0/13 (0)	5/13 (38)	4/13 (31)	4/13 (31)
<b>Zlatiborski</b>	2014	3/25 (12, ±12,74)	3/3 (100)	0/3 (0)	1/3 (33)	0/3 (0)	2/3 (67)	0/3 (0)
	2013	5/25 (20, ±15,68)	1/5 (20)	4/5 (80)	0/5 (0)	5/5 (100)	0/5 (0)	0/5 (0)
	2012	1/25 (4, ±7,68)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)

#### 5.1.4. *ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV CIRKOVIRUSA 2 SVINJA*

PCV2 infekcija kod divljih svinja je prisutna u manjem obimu u odnosu na Aujeckijevu bolest i PPV infekciju, s tim da je prevalencija u 2014. godini značajno veća u odnosu na 2012. i 2013, tabela 25. Ipak, razlike u prevalenciji kod različitih polova i starosnih kategorija nisu statistički značajne ( $p > 0,05$ ).

Aktivna infekcija je dokazana u rasinskom i zlatiborskom okrugu, dok je na osnovu titra IgM i IgG procenjeno da je infekcija u šumadijskom, braničevskom i borskom okrugu stara 1-2 meseca.

Detaljan prikaz rezultata u odnosu na starost i pol divljih svinja je prikazan u tabeli 26.

Tabela 25: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv PCV2

Godina	Prev (%, CI 95%)	POL		STAROST			
		Muški (%, CI 95%)	Ženski (%, CI 95%)	0-6 meseci (%, CI 95%)	6-18 meseci (%, CI 95%)	1,5-2,5 godine (%, CI 95%)	>2,5 godine (%, CI 95%)
<b>2014</b>	44/200 (22, ±5,74)	27/118 (23, ±7,59)	16/782 (20, ±8,66)	3/9 (33, ±30,72)	21/107 (20, ±7,58)	9/43 (21, ±12,17)	9/41 (22, ±12,68)
<b>2013</b>	24/200 (12, ±4,4)	16/96 (17 (±7,51)	8/104 (8, ±5,21)	4/42 (10, ±9,07)	5/121 (4, ±3,49)	10/31 (32, ±16,42)	5/6 (83, ±30,06)
<b>2012</b>	28/200 (14, ±4,81)	15/101 (15, ±6,96)	14/99 (14, ±6,84)	4/23 (17, ±15,35)	11/67 (16, ±8,78)	10/75 (13, ±7,61)	4/35 (11, ±10,37)
<b>UKUPNO</b>		58/315 (18, ±4,24)	38/285 (13, ±3,9)	11/74 (15, ±8,14)	37/295 (13, ±3,84)	29/149 (19, ±6,3)	18/82 (22, ±8,97)

Tabela 26: Rezultati ispitivanja divljih svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv PCV2 po okruzima

Okrug	Godina	Ukupno (%, CI 95%)	POL		STAROST			
			Muški (%)	Ženski (%)	0-6 meseci (%)	6-18 meseci (%)	1,5-2,5 godine(%)	>2,5 godine (%)
Beogradski	2014	2/5 (40, ±42,94)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)	1/2 (50)	1/2 (50)
	2013	0/5 (0)	0	0	0	0	0	0
	2012	1/5 (20, ±35,06)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
Borski	2014	5/30 (17, ±13,44)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	4/5 (80)	1/5 (20)	0/5 (0)
	2013	3/30 (10, ±10,74)	2/3 (75)	1/3 (25)	1/3 (25)	0/3 (0)	2/3 (75)	0/3 (0)
	2012	6/30 (20, ±14,31)	4/6 (67)	2/6 (33)	0/6 (0)	3/6 (50)	1/6 (17)	2/6 (23)
Braničevski	2014	6/25 (24, ±16,74)	4/6 (67)	2/6 (33)	0/6 (0)	5/6 (83)	1/6 (17)	0/6 (0)
	2013	4/25 (16, ±14,37)	2/4 (50)	2/4 (50)	0/4 (0)	1/4 (25)	1/4 (25)	2/4 (50)
	2012	2/25 (8, ±10,63)	0/2 (0)	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
Moravički	2014	6/10 (60, ±30,36)	4/6 (67)	2/6 (33)	0/6 (0)	2/6 (33)	1/6 (17)	3/6 (50)
	2013	0/10 (0)	0	0	0	0	0	0
	2012	1/10 (10, ±18,59)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
Pomoravski	2014	8/25 (32, ±18,29)	5/8 (63)	3/8 (37)	1/8 (13)	2/8 (25)	2/8 (25)	3/8 (37)
	2013	5/25 (20, ±15,68)	4/5 (80)	1/5 (20)	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5 (0)	3/5 (60)
	2012	7/25 (28, ±17,6)	2/7 (29)	5/7 (71)	0/7(0)	5/7 (71)	2/7 (29)	0/7 (0)
Rasinski	2014	7/20 (35, ±20,09)	4/7 (57)	3/7 (43)	0/7 (0)	4/7 (57)	2/7 (29)	1/7 (14)
	2013	5/20 (25, ±18,98)	4/5 (8)	1/5 (20)	1/5 (20)	1/5 (20)	3/5 (60)	0/5 (0)
	2012	7/20 (35, ±20,09)	3/7 (43)	4/7 (57)	1/7 (14)	0/7 (0)	5/7 (72)	1/7 (14)
Raški	2014	4/29 (20, ±17,53)	3/4 (75)	1/4 (25)	1/4 (25)	1/4 (25)	2/4 (50)	0/4 (0)
	2013	5/20 (25, ±18,98)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	2/5 (40)	2/5 (40)	0/5 (0)
	2012	3/20 (15, ±15,65)	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/3 (67)	0/3 (0)	1/3 (33)
Šumadijski	2014	2/10 (20, ±24,79)	1/2 (59)	1/2 (50)	0/2 (0)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)

	2013	1/10 (10, ±18,59)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
	2012	0/10 (0)	0	0	0	0	0	0
<b>Zaječarski</b>	2014	1/30 (3, ±6,1)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)
	2013	1/30 (3, ±6,1)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
	2012	2/30 (7, ±9,13)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)
<b>Zlatiborski</b>	2014	2/25 (8, ±10,63)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)
	2013	0/25 (0)	0	0	0	0	0	0
	2012	0/25 (0)	0	0	0	0	0	0

#### *5.1.5. ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV VIRUSA INFLUENCE SVINJA A*

Specifična antitela protiv virusa influence svinja nisu dokazana ni u jednom od 600 krvnih seruma divljih svinja što na osnovu analize Survey Toolbox softverom potvrđuje odsustvo (seroprevalencija niža od 1%) influence A kod divljih svinja sa sigurnošću od 100%.

#### *5.1.6. ISPITIVANJE PRISUSTVA SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV VIRUSA TRANSMISIVNOG GASTROENTERITISA/RESPIRATORNOG CORONAVIRUSA SVINJA*

Specifična antitela protiv virusa transmisivnog gastroenteritisa/respiratornog Coronavirusa svinja nisu dokazana ni u jednom od 600 ispitanih krvnih seruma divljih svinja. Uzevši u obzir osetljivost (93,3%) i specifičnost (94,3%) korišćenog ELISA testa, sa sigurnošću od 100% se može smatrati da je TGE/PRCV infekcija odsutna kod divljih svinja, odnosno da je prevalencija niža od 1%.

### **5.2. REZULTATI ISPITIVANJA UZORAKA BOLESNIH DIVLJIH SVINJA**

Uzorci bolesnih divljih svinja iz borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, raškog i zaječarskog okruga su razvrstani prema polu i starosti, tabela 27. Ukupno je pregledano 50 divljih svinja, 64% muškog (n=32) i 36% (n=18) ženskog pola. U odnosu na starost, najviše divljih svinja je pripadalo grupi 6-18 meseci starosti (n=32, 64%).

Iz ostalih okruga, nije bilo prijavljenih divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti.

Tabela 27: Struktura pregledanih uzoraka divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti

OKRUG	POL		STAROST			
	Muški (%)	Ženski (%)	0-6 meseci (%)	6-18 meseci (%)	1,5-2,5 godine (%)	> 2,5 godine (%)
<b>Borski</b>	9/18 (50)	9/18 (50)	0	13/18 (72)	3/18 (17)	2/18 (11)
<b>Braničevski</b>	3/6 (50)	3/6 (50)	0	5/6 (83)	0	1/6 (17)
<b>Moravički</b>	6/8 (75)	2/8 (25)	1 (12,5)	3/8 (37,5)	0	4/8 (50)
<b>Pomoravski</b>	2/2 (100)	0/2 (0)	0	0	0	2/2 (100)
<b>Raški</b>	3/4 (75)	1/4 (25)	0	4/4 (100)	0	0
<b>Zaječarski</b>	9/12 (75)	3/12 (25)	0	7/12 (58)	2/12 (17)	3/12 (25)
<b>UKUPNO</b>	32/50 (64)	18/50 (36)	1/50 (2)	32/50 (64)	5/50 (10)	12/50 (24)

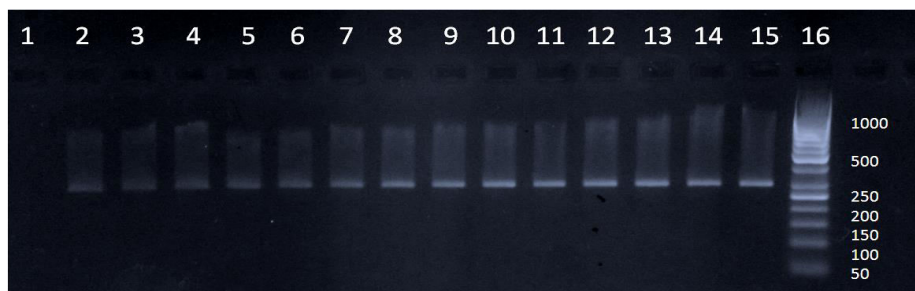
### 5.2.1. REZULTATI ISPITIVANJA ORGANA DIVLJIH SVINJA NA PRISUSTVO VIRUSA UZROČNIKA BOLESTI

RT-PCR, RT-qPCR i PCR testom, genom virusa PRRS-a, transmisivnog gastroenteritisa/PRCV, influence svinja, PPV i PCV2 nije dokazan u uzorcima organa poreklom od divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti.

PCR testom kod 13 (26%) divljih svinja je dokazan genom virusa Aujeckijeve bolesti, slike 15-17.



Slika 15: Prikaz gel elektroforeze PCR proizvoda dužine 550 bp za us9 gen za 13 pozitivnih divljih svinja (linija 1: negativna kontrola, linija 2: pozitivna kontrola (PRV NIA3 soj virusa), linije 3-15: uzorci od divljih svinja, linija 16: molekularni marker)



Slika 16: Prikaz gel elektroforeze PCR proizvoda dužine 294 bp za us4 gen za 13 pozitivnih divljih svinja (linija 1: negativna kontrola, linija 2: pozitivna kontrola (PRV NIA3 soj virusa), linije 3-15: uzorci od divljih svinja, linija 16: molekularni marker)





Slika 17: Prikaz gel elektroforeze PCR proizvoda dužine 447 bp za ul49,5 gen za 13 pozitivnih divljih svinja (linija 1: negativna kontrola, linija 2: pozitivna kontrola (PRV NIA3 soj virusa), linije 3-15: uzorci od divljih svinja, linija 16: molekularni marker)

S obzirom na značajne razlike u ponašanju divljih svinja različitih starosnih kategorija i polova u smislu ostvarivanja efikasnih kontakata i mogućnosti nastanka zaraze, rezultati su predstavljeni u odnosu na različite grupe divljih svinja, tabela 28.

Veći procenat PCR pozitivnih divljih svinja uočen je kod mužjaka (n=10, 31%) u poređenju sa ženskim divljim svinjama (n=3, 17%), ali se ovaj rezultat ne može smatrati statistički značajnim (p=0,21, p>0,05).

Većina PCR pozitivnih životinja je pripadala grupi 6-18 meseci starosti (n=12, 92%), ali s obzirom na mali broj uzoraka, ova razlika nije statistički značajna (p=0,32, p>0,05).

Tabela 28: Rezultati molekularnih ispitivanja prisustva genoma virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima organa divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti

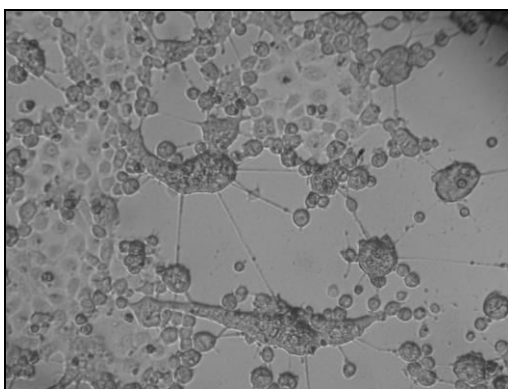
OKRUG	POL		STAROST	
	Muški (%)	Ženski (%)	6-18 meseci (%)	> 2,5 godine (%)
<b>Braničevski</b>	5/8 (62,5)	3/8 (37,5)	8/8 (100)	0
<b>Pomoravski</b>	1/1 (100)	0	0	1/1 (100)
<b>Raški</b>	1/1 (100)	0	1/1 (100)	0
<b>Zaječarski</b>	3/3 (100)	0	3/3 (100)	0
<b>UKUPNO</b>	10/13 (77)	3/13 (23)	12/13 (92)	1/13 (8)

Izolacijom virusa na kulturi tkiva, virus Aujeckijeve bolesti je izolovan kod 4 od 13 uzoraka (30,8%) kod kojih je prethodno dokazan genom ovog virusa, tabela 29.

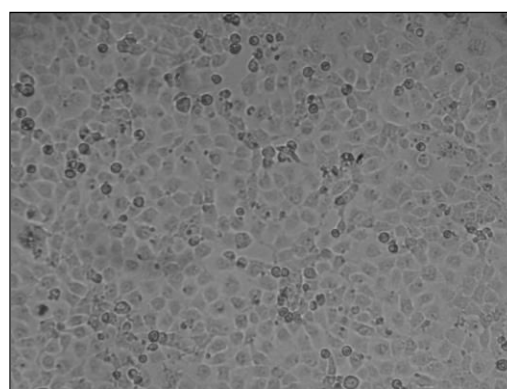
Tabela 29: Rezultati izolacije virusa na kulturi tkiva prikazni u odnosu na pol i starost divljih svinja

OKRUG	POL		STAROST	
	Muški (%)	Ženski (%)	6-18 meseci (%)	> 2,5 godine (%)
<b>Braničevski</b>	3/3 (100)	0	3/3 (100)	0
<b>Zaječarski</b>	1/1 (100)	0	1/1 (100)	0
<b>UKUPNO</b>	4/4 (100)	0	4/4 (100)	0

Citopatogeni efekat (slike 18 i 19) je kod dva uzorka uočen već posle 24 h, a potom kod još dva, prvog za 48 h i drugog za 72 h. U narednoj pasaži iz uzoraka kod kojih nije došlo do pojave CPE, virus Aujeckijeve bolesti nije izolovan.



Slika 18: CPE virusa Aujeckijeve bolesti na PK15 ćelijskoj liniji



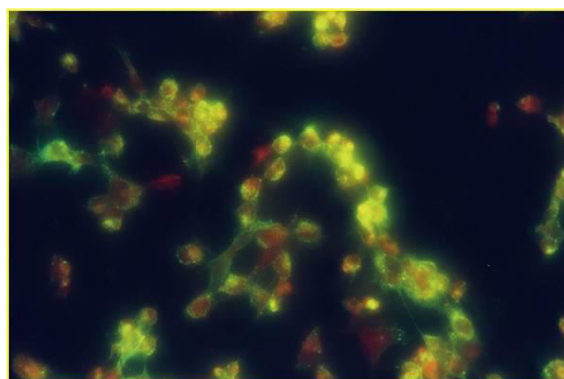
Slika 19: Neinficirana PK15 ćelijska linija

Ispitivanjem osetljivosti ćelijskih linija za virus Aujeckijeve bolesti, utvrđeno je da je linija poreklom od svinja (PK15) neznatno osetljivija, tabela 30.

Tabela 30: Rezultati ispitivanja osetljivosti tri ćelijske linije za virus Aujeckijeve bolesti

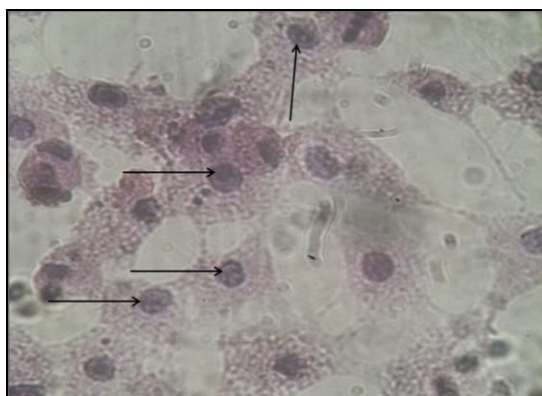
	Pojava CPE za 24h	Pojava CPE za 48h	Pojava CPE za 72h
<b>PK15</b>	2	1	1
<b>MDBK</b>	1	1	2
<b>RK13</b>	1	2	1

Virus Aujeckijeve bolesti je identifikovan imunofluorescencijom (slika 20) i neutralizacijom virusa specifičnim antitelima gde je odsustvo citopatogenog efekta potvrda identiteta virusa.



Slika 20: PK15 ćelijska linija inficirana virusom Aujeckijeve bolesti; detekcija virusa imunofluorescentnom tehnikom posmatrana pod UV mikroskopom

Karakteristika virusa Aujeckijeve bolesti da stvara intranuklearne inkluzije je potvrđena histološkim bojenjem hematoksinom eozinom, slika 21.



Slika 21: PK15 ćelijska linija inficirana virusom Aujeckijeve bolesti i obojena hematoksilin eozinom gde se uočavaju intranuklearne inkluzije

Filogenetska analiza 13 sojeva virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena za 3 regiona, us9, us4 i ul49,4 njihovim poređenjem sa dostupnim sekvencama u banci gena kao i sa sekvencama virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih iz domaćih životinja kod nas. Pokazano je da su sojevi virusa iz divljih svinja, ali i domaćih životinja, najbliži soju Kaplan, ali da su razlike između sojeva iz divljih svinja i sojeva iz domaćih životinja neznatne, tabela 31.

Tabela 31: Međusobna udaljenost sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih iz divljih i domaćih svinja

GEN	Međusobna udaljenost sojeva iz divljih svinja	Međusobna udaljenost sojeva iz divljih i domaćih svinja
<b>us9</b>	0,002	0,032
<b>us4</b>	0,000	0,000
<b>ul49,5</b>	0,0006	0,0009

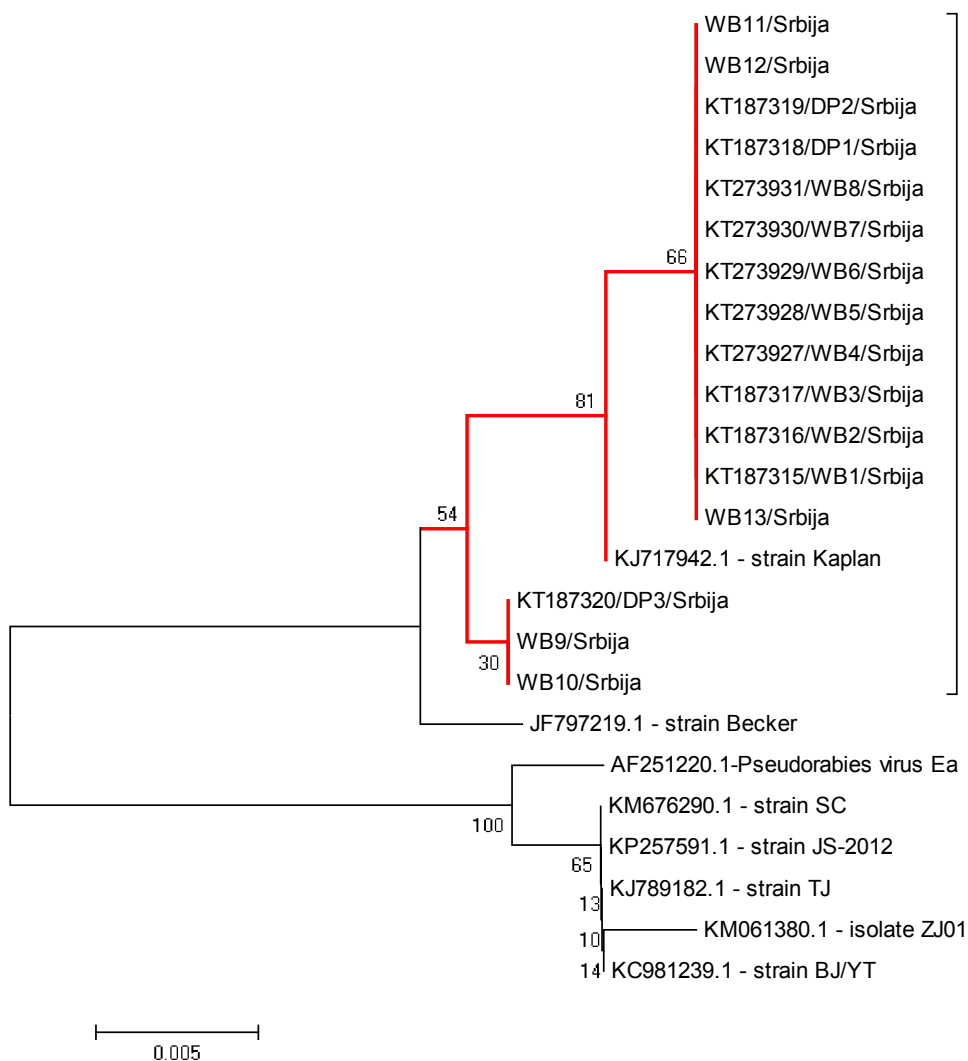
Odnos i udaljenost sojeva virusa izolovanih iz divljih svinja i vakcinalnog Bartha i ostalih sojeva koji su korišćeni za filogenetsku analizu su prikazani u tabeli 32.

Tabela 32: Međusobna udaljenost sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih iz divljih svinja, vakcinalnog Bartha soja i ostalih sojeva

<b>GEN</b>	<b>Međusobna udaljenost sojeva iz divljih svinja i Bartha vakcinalnog soja</b>	<b>Međusobna udaljenost sojeva iz divljih i ostalih sojeva virusa</b>
<b>us9</b>	0,0012	0,031
<b>us4</b>	0,000	0,0041
<b>ul49,5</b>	0,039	0,0185

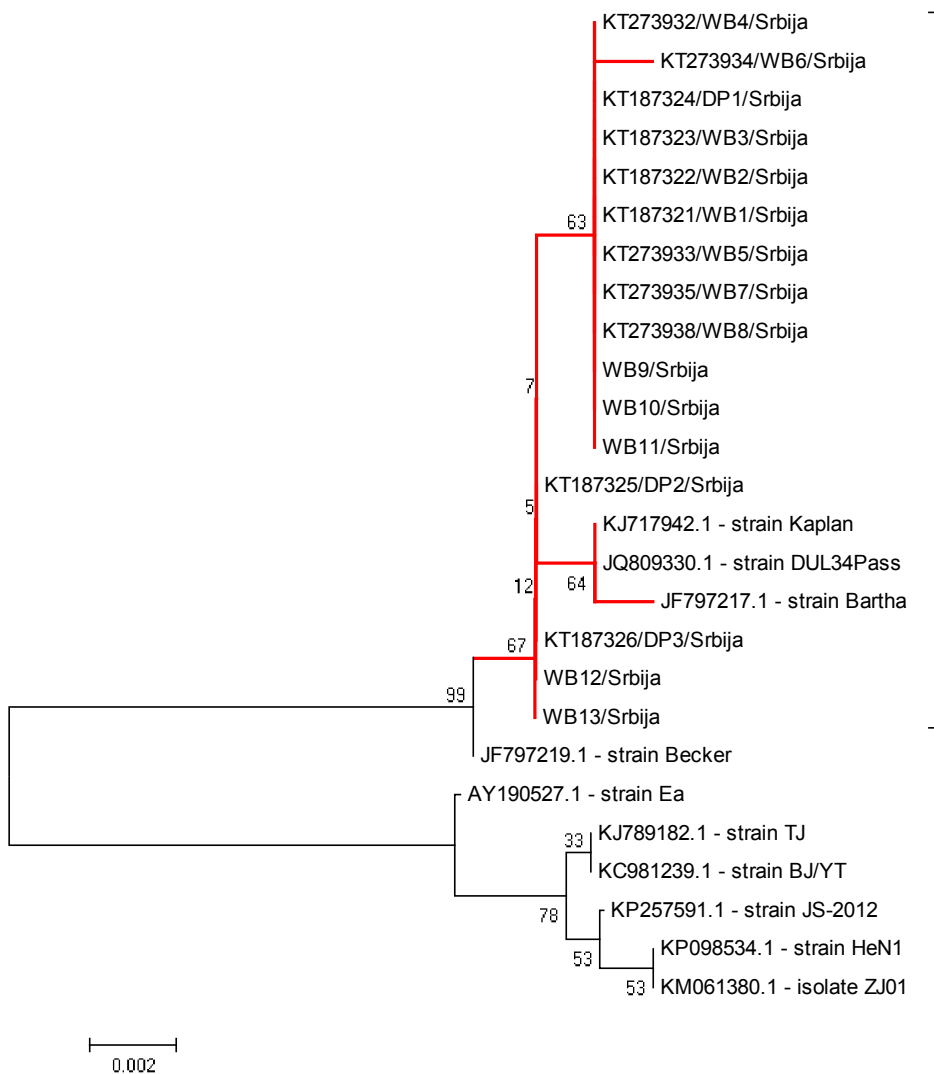
Najveća udaljenost između sojeva virusa iz divljih i domaćih životinja je utvrđena za us9 gen (3,2%), a zatim za ul49,5 gen. Međutim, za gen us4 ovi sojevi su identični (udaljenost 0%). Upoređujući sekvence sojeva izolovanih iz divljih svinja i drugih sojeva koji su korišćeni za konstruisanje filogenetskog stabla, utvrđena je najveća udaljenost za us9 gen (3,1%), potom za ul49,5 (1,8%) i us4 gen (0,4%). Određena udaljenost, ali najviša za ul49,5 gen (3,9%), je utvrđena između vakcinalnog Bartha soja i sojeva izolovanih iz divljih svinja.

Analizom us9 gena, Neighbor-Joining metodom, obuhvaćena su 24 soja virusa Aujeckijeve bolesti, slika 22. Sojevi izolovani iz divljih svinja su registrovani u banci gena pod brojevima: KT187315, KT187316, KT187317, KT273927, KT273928, KT273929, KT273930, KT273931.



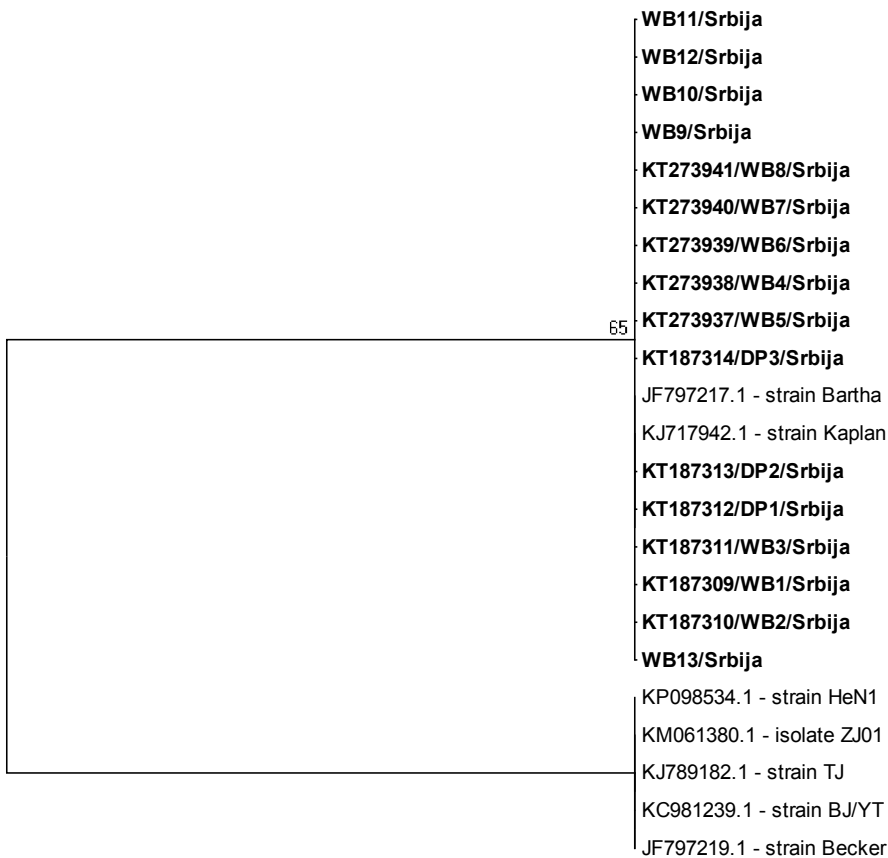
Slika 22: Filogenetsko stablo za us9 gen konstruisano Neighbor-Joining metodom sa ukupnom dužinom grana od 0,049 u MEGA6 programu. Pored grana je prikazana procena pouzdanosti filogenetskog stabla na osnovu 1000 ponavljanja ("bootstrap" metoda). WB: divlja svinja, DP1: domaća svinja, DP2: pas, DP3: domaća svinja

Za filogetsku analizu ul49,5 gena je korišćeno 26 dostupnih sekvenci, slika 23. Filogenetsko stablo je konstruisano Neighbor-Joining metodom, a sekvence domaćih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti su dostupne u NCBI pod brojevima: KT187321, KT187322, KT187323, KT273932, KT273933, KT273934, KT273935, KT273938.



Slika 23: Filogenetsko stablo za ul49,5 gen konstruisano Neighbor-Joining metodom sa ukupnom dužinom grana od 0,033 u MEGA6 programu. Pored grana je prikazana procena pouzdanosti filogenetskog stabla na osnovu 1000 ponavljanja ("bootstrap" metoda). WB: divlja svinja, DP1: domaća svinja, DP2: pas, DP3: domaća

Za prikazivanje evolutivnog odnosa između sojeva virusa na osnovu us4 gena, korišćene su 23 sekvence i Neighbor-Joining metoda, slika 24. Sekvence us4 gena sojeva virusa izolovanih iz divljih svinja iz Srbije su dostupni u NCBI pod brojevima: KT187309, KT187310, KT187311, KT273937, KT273938, KT273939, KT273940, KT273941.



Slika 24: Filogenetsko stablo za us4 gen konstruisano Neighbor-Joining metodom sa ukupnom dužinom grana od 0,0049 u MEGA6 programu. Pored grana je prikazana procena pouzdanosti filogenetskog stabla na osnovu 1000 ponavljanja ("bootstrap" metoda). WB: divlja svinja, DP1: domaća svinja, DP2: pas, DP3: domaća svinja



### *5.2.2. REZULTATI ISPITIVANJA KRVNIH SERUMA DIVLJIH SVINJA NA PRISUSTVO SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV VIRUSA AUJECKIJEVE BOLESTI*

Od 50 pregledanih krvnih seruma, kod 64% (n=32) su dokazana specifična antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti. Neznatno veći procenat divljih svinja ženskog pola (n=12, 67%) je reagovalo pozitivno u odnosu na muški pol (n=20, 63%) (p=0,63, p>0,05). Statistički značajne razlike nisu utvrđene ni za različite starosne kategorije (p=0,05, p>0,05).

Najviše divljih svinja reagovalo je u titru 1:8 (n=7, 22%) i 1:16 (n=6, 19%). Titar antitela 1:256 (n=2, 6%) i 1:512 (n=2, 6%) imale su životinje iz kategorija svinja starijih od 1,5 godine. Rezultati su prikazani u tabeli 33 u odnosu na starosne kategorije, pol i visinu titra antitela.

Zbog specifičnosti herpesvirusa da uspostavljaju latentne infekcije, serološki rezultati smatraju se veoma korisnim u tumačenju rezultata molekularne dijagnostike, tabela 34.

Tabela 33: Rezultati seroloških ispitivanja divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti na prisustvo i visinu titra antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti

<b>SEROLOŠKI REZULTATI</b>											
<b>STAROST</b>	<b>Pol</b>			<b>Titara antitela</b>							
	Muški (%)	Ženski (%)	Ukupno (% CI 95%)	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<b>0-6 meseci</b>	1/1 (100)	0	1/1 (100)	1/1 (100)	0	0	0	0	0	0	0
<b>6-18 meseci</b>	9/19 (47)	9/13 (69)	18/32 (56, ±15,56)	3/18 (17)	6/18 (33)	3/18 (17)	2/18 (11)	1/18 (6)	3/18 (17)	0	0
<b>1,5-2,5 god.</b>	2/3 (67)	1/2 (50)	3/5 (60, ±35,06)	0	0	0	0	1/3 (33)	0	1/3 (33)	1/3 (33)
<b>&gt; 2,5 godine</b>	8/9 (89)	2/3 (67)	10/12 (83, ±21,25)	1/10 (10)	1/10 (10)	3/10 (30)	3/10 (30)	0	0	1/10 (10)	1/10 (10)
<b>UKUPNO</b>	20/32 (63)	12/18 (67)	32/50 (64, ±12,7)	5/32 (16)	7/32 (22)	6/32 (19)	5/32 (16)	2/32 (6)	3/32 (9)	2/32 (6)	2/32 (6)

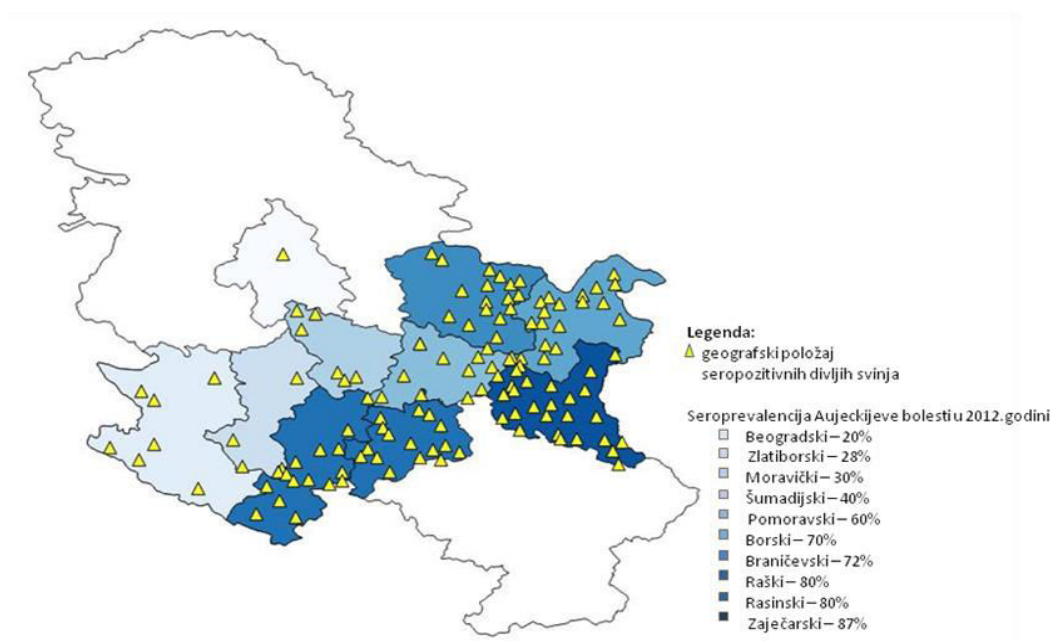
Tabela 34: Rezultati seroloških ispitivanja divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti u odnosu na rezultate molekularnih ispitivanja

OKRUG	PCR rezultat	Titar antitela								
		<1:4 (%)	1:4 (%)	1:8 (%)	1:16 (%)	1:32 (%)	1:64 (%)	1:128 (%)	1:256 (%)	1:512 (%)
Braničevski	+	4/8 (50)	0	2/8 (25)	1 (12,5)		1 (12,5)	0	0	0
	-	4/10 (40)	0	0	0	0	1 (10)	3 (30)	1 (10)	1 (10)
Pomoravski	+	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)
Raški	+	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	3 (100)	0	0	0	0
Zaječarski	+	1 (33,3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	0	0	0
	-	1 (11)	1 (11)	3 (33,3)	3 (33,3)	1 (11)	0	0	0	0

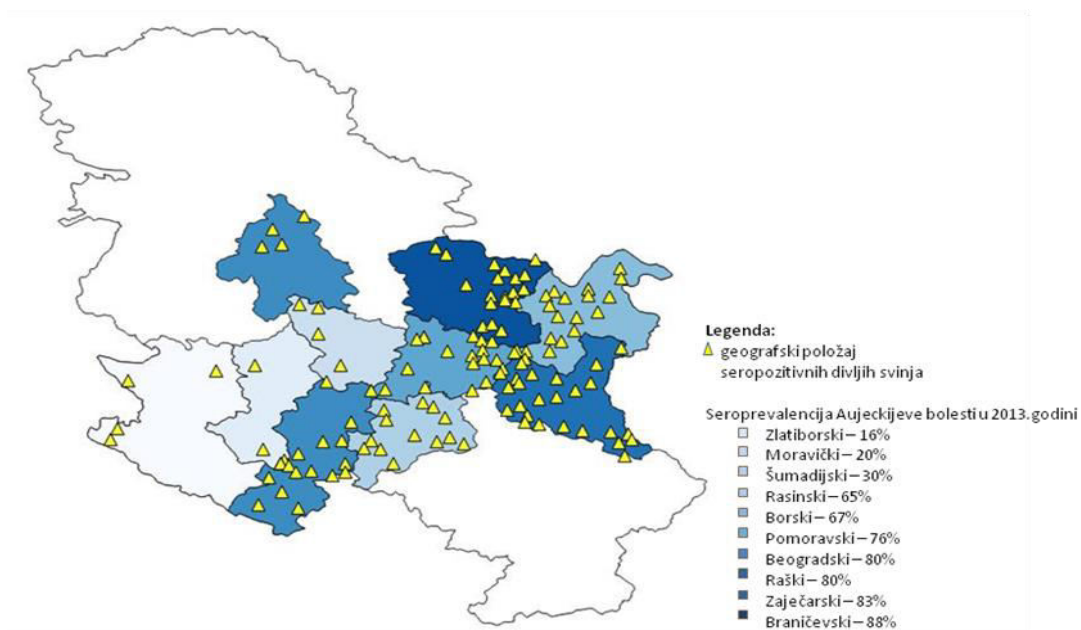
## 5.3.GEOGRAFSKO POZICIONIRANJE I ANALIZA RIZIKA

### 5.3.1. GEOGRAFSKO POZICIONIRANJE

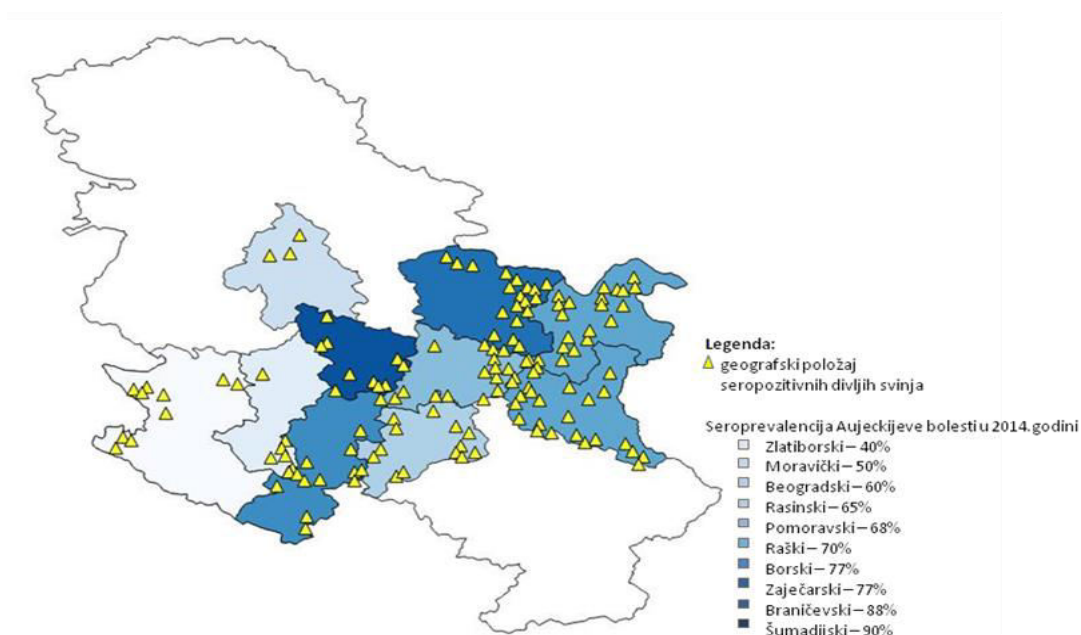
Korišćenjem različitih softverskih alata i geografskih koordinata, kreirane su mape na kojima je, po okruzima i godinama, prikazana seroprevalencija predstavljena različitim intenzitetom boje i geografska pozicija seropozitivnih divljih svinja, slike 25-33.



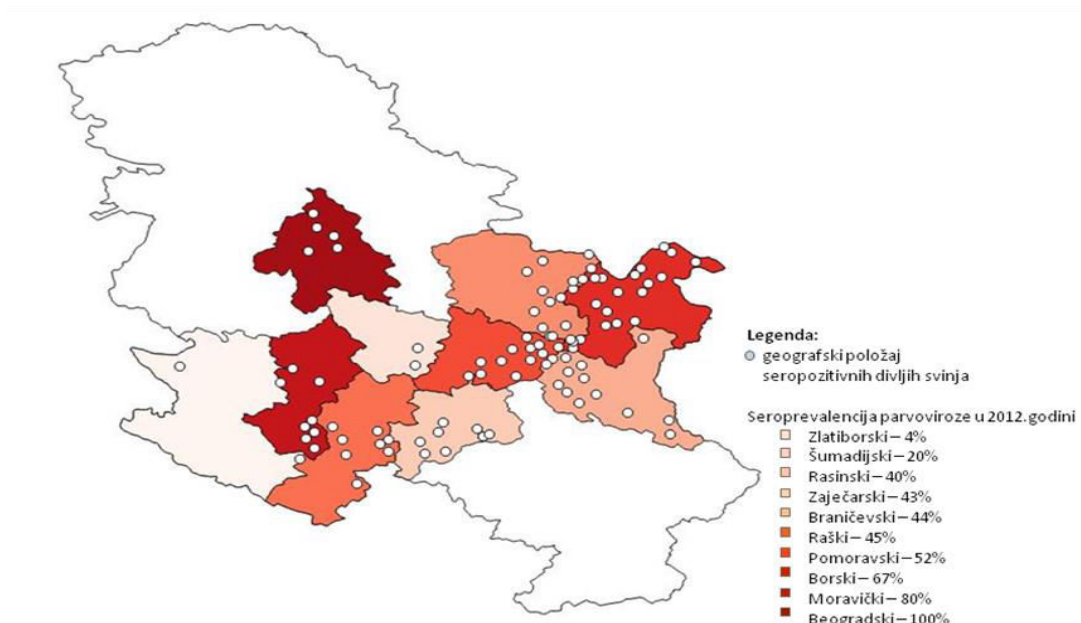
Slika 25: Seroprevalencija Aujeckijeve bolesti u 2012. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



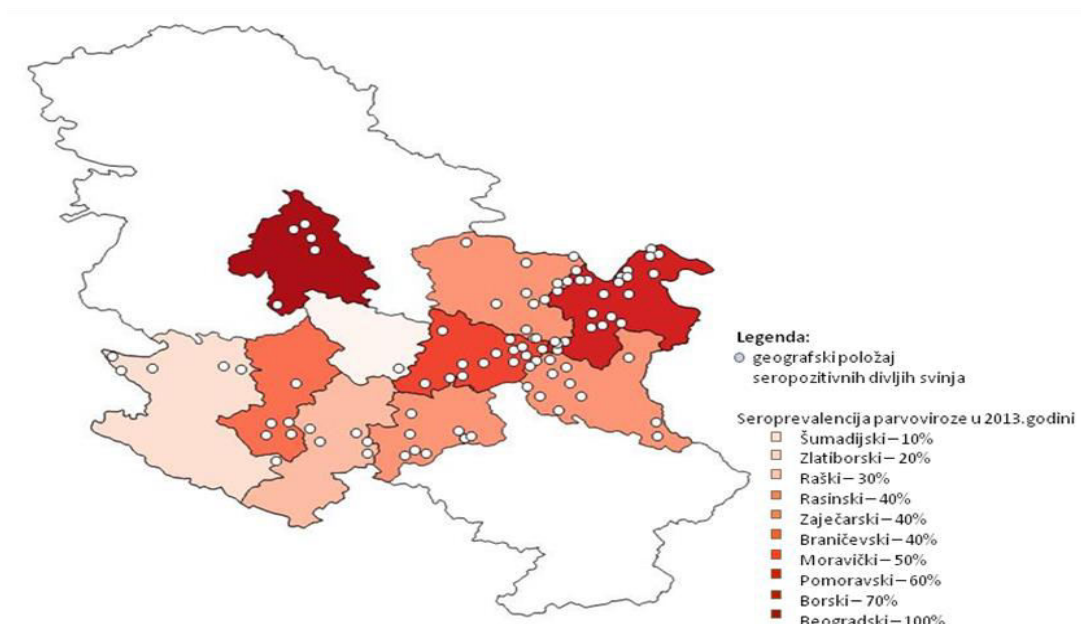
Slika 26: Seroprevalencija Aujeckijeve bolesti u 2013. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



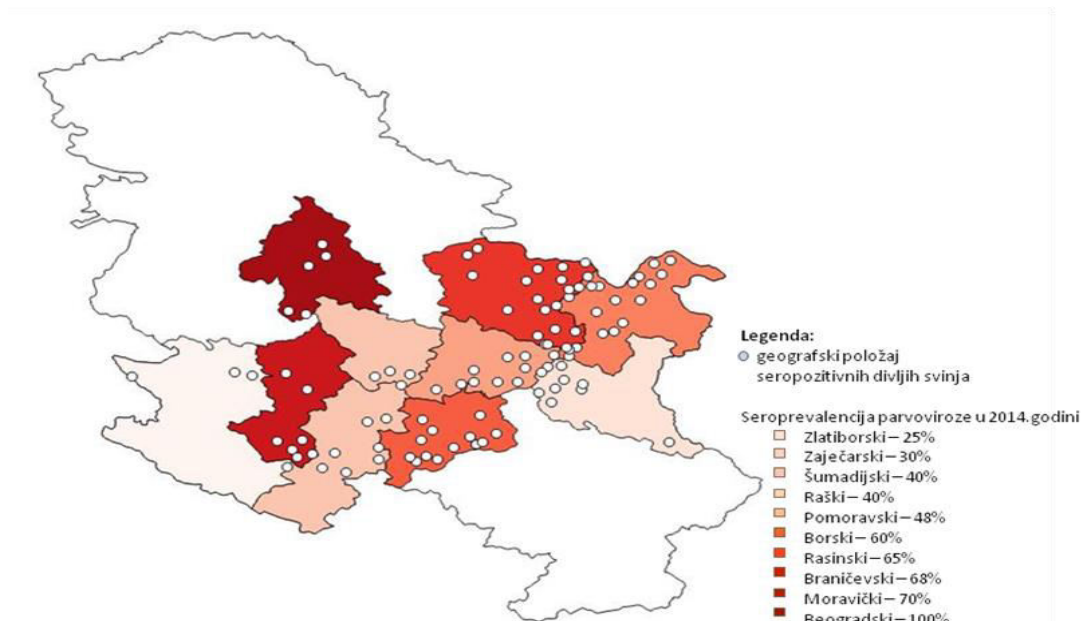
Slika 27: Seroprevalencija Aujeckijeve bolesti u 2014. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



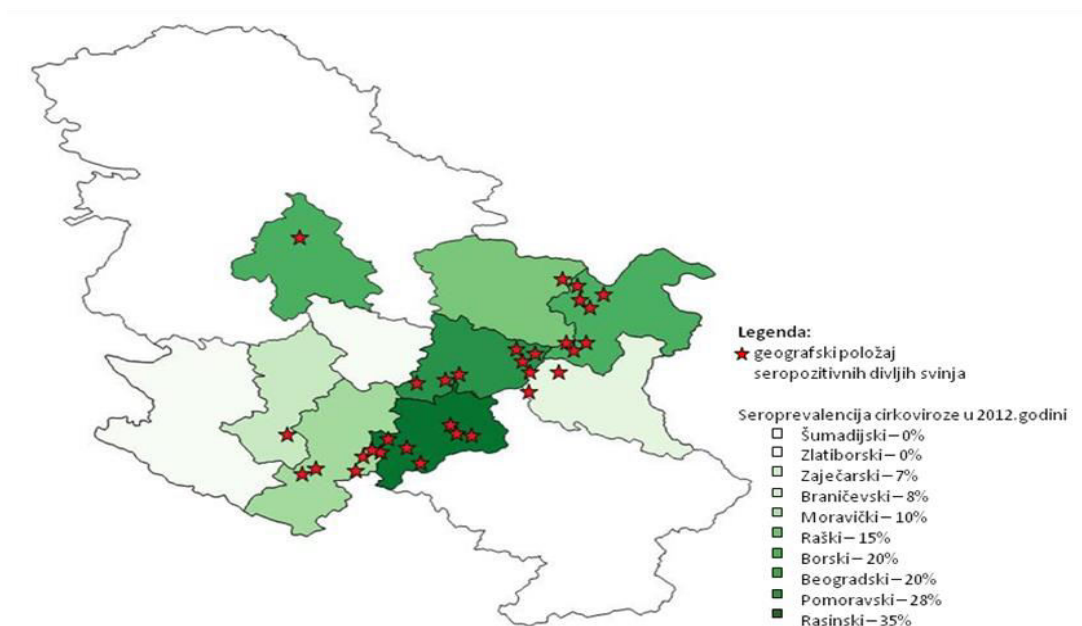
Slika 28: Seroprevalencija PPV infekcije u 2012. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



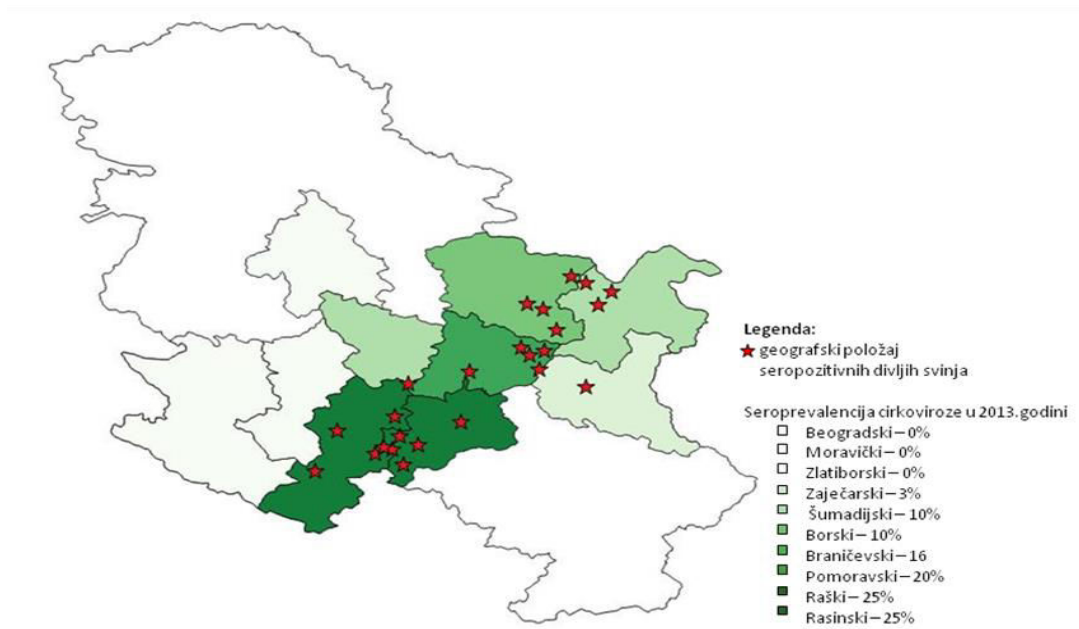
Slika 29: Seroprevalencija PPV infekcije u 2013. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



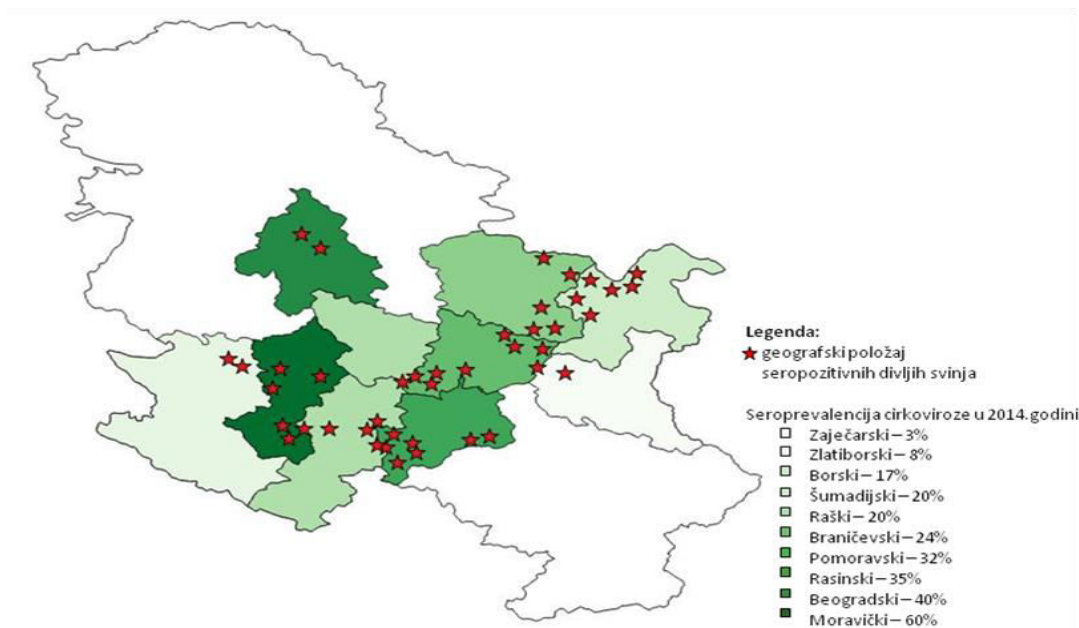
Slika 30: Seroprevalencija PPV infekcije u 2014. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



Slika 31: Seroprevalencija PCV2 infekcije u 2012. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja



Slika 32: Seroprevalencija PCV2 infekcije u 2013. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja

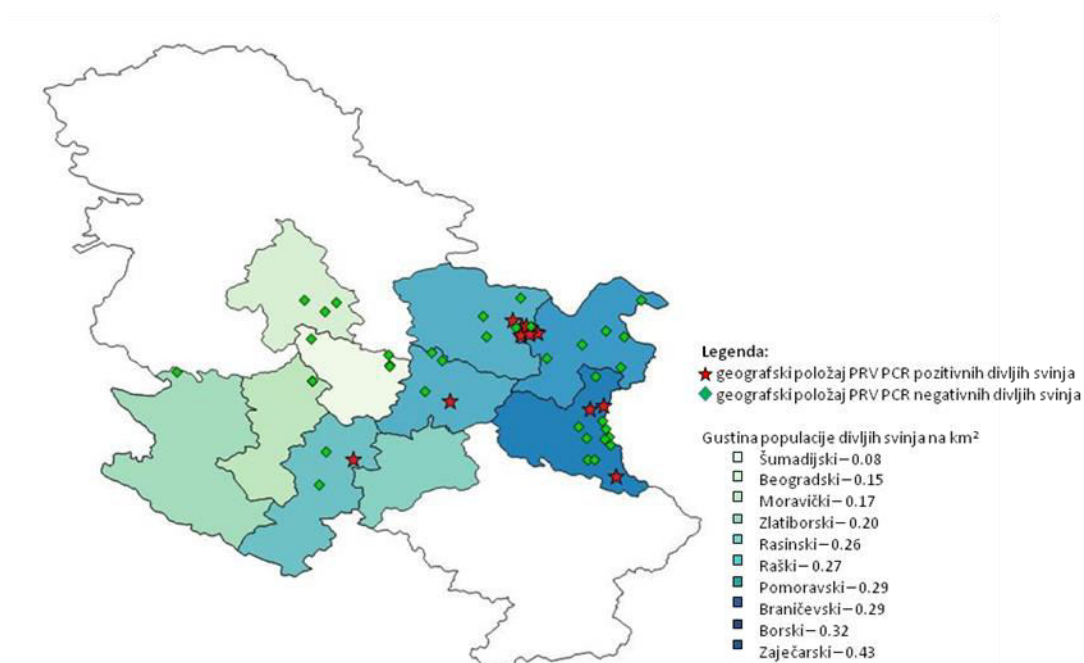


Slika 33: Seroprevalencija PCV2 infekcije u 2014. godini sa prikazom lokacija serološki pozitivnih divljih svinja

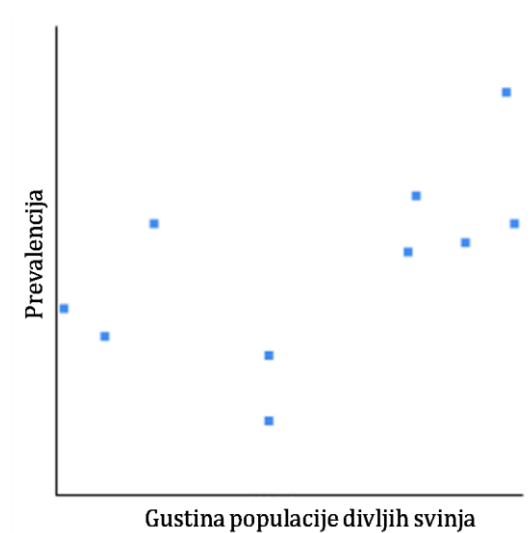


### 5.3.2. UTVRĐIVANJE KORELACIJE IZMEĐU POJAVE BOLESTI I GUSTINE POPULACIJE DIVLJIH I DOMAĆIH SVINJA

Korišćenjem Pirsonovog koeficijenta korelacije, utvrđena je srednja pozitivna korelacija između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije divljih svinja ( $r=0,6$ ), slike 34 i 35. Ovaj rezultat ukazuje na postojanje direktne veze između broja divljih svinja i njihove gustine i pojave Aujeckijeve bolesti.

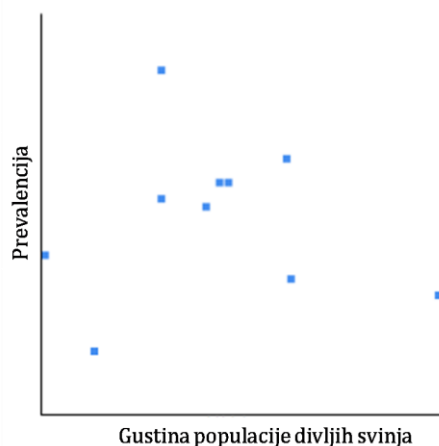


Slika 34: Geografski prikaz lokacija PCR pozitivnih divljih svinja na virus Aujeckijeve bolesti u odnosu na gustinu populacije divljih svinja

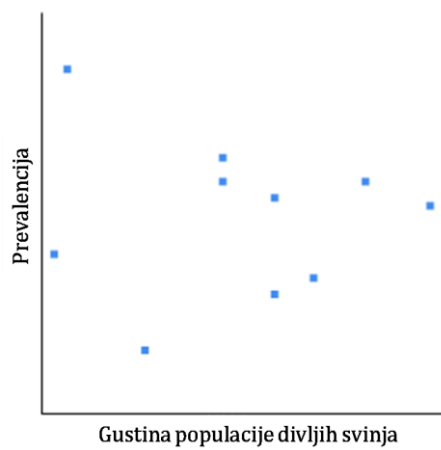


Slika 35: Prikaz pozitivne korelacije između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije divljih svinja

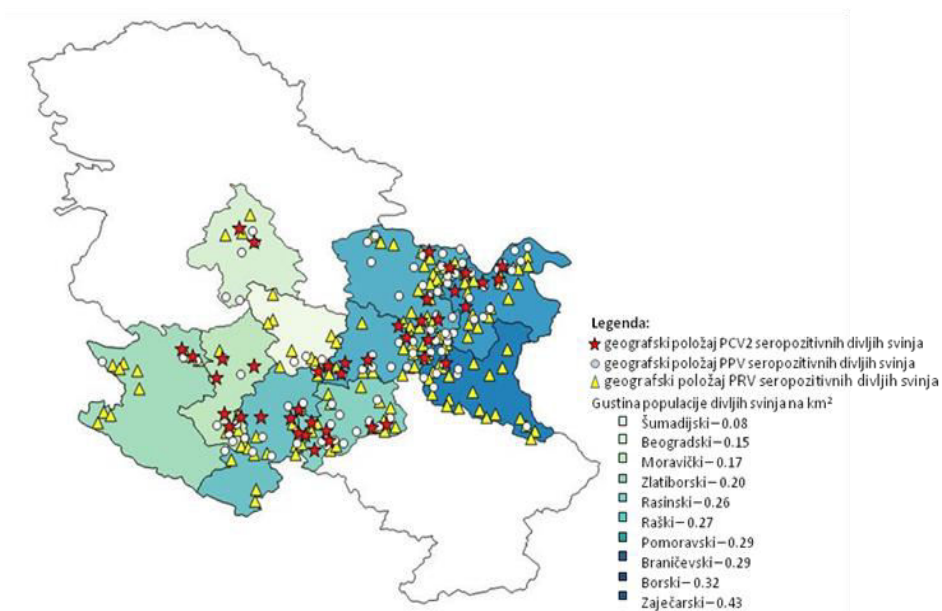
Odnos prevalencije PPV ( $r=-0,05$ ) i PCV2 ( $r=-0,09$ ) infekcije i gustine populacije divljih svinja prema Pirsonovom koeficijentu korelacije predstavlja blagu negativnu korelaciju, slike 36-38. Prema vrednostima koeficijenata  $r$  koji se približavaju nuli može se smatrati da je korelacija između ova dva parametra odsutna, tj. da pojava PPV i PCV2 infekcije nisu u funkciji gustine populacije divljih svinja.



Slika 36: Prikaz korelacije između seroprevalencije PPV infekcije i gustine populacije divljih svinja

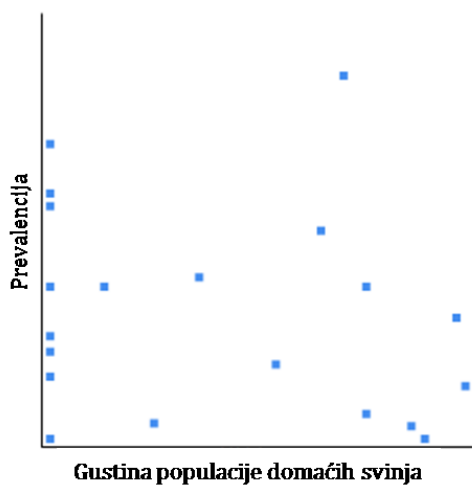


Slika 37: Prikaz korelacije između seroprevalencije PCV2 infekcije i gustine populacije divljih svinja

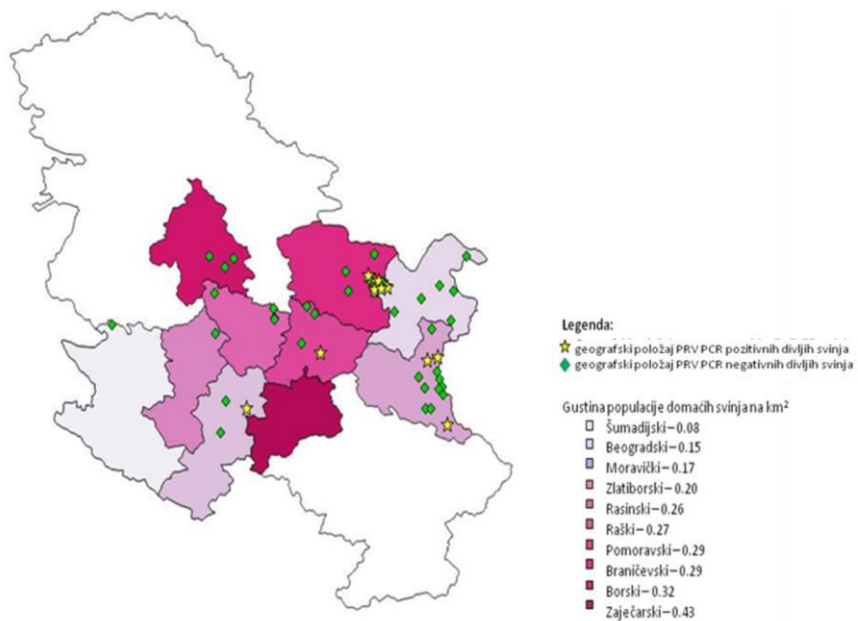


Slika 38: Geografski prikaz lokacija serološki pozitivnih divljih svinja na Aujeckijevu bolest, PPV i PCV2 infekciju prikazane u odnosu na gustinu populacije divljih svinja

Za razliku od značaja gustine divljih svinja za pojavu Aujeckijeve bolesti, utvrđeno je da gustina domaćih svinja nema uticaja na pojavu ove bolesti kod divljih svinja ( $r = -0,2$ ), slike 39 i 40.

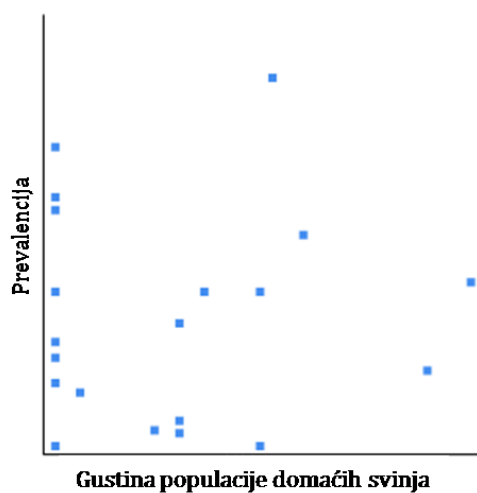


Slika 39: Prikaz korelacije između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije domaćih svinja

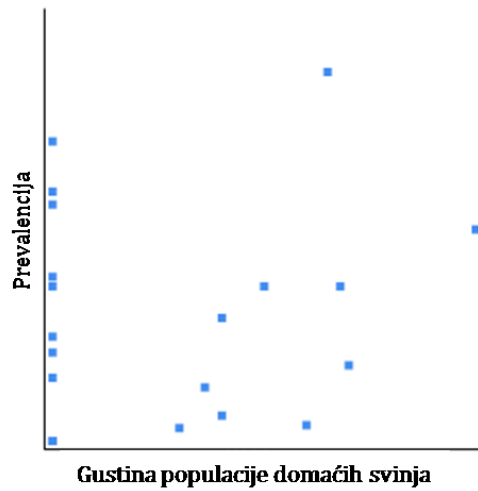


Slika 40: Geografski prikaz lokacija PCR pozitivnih divljih svinja na virus Aujeckijeve bolesti u odnosu na gustinu populacije domaćih svinja

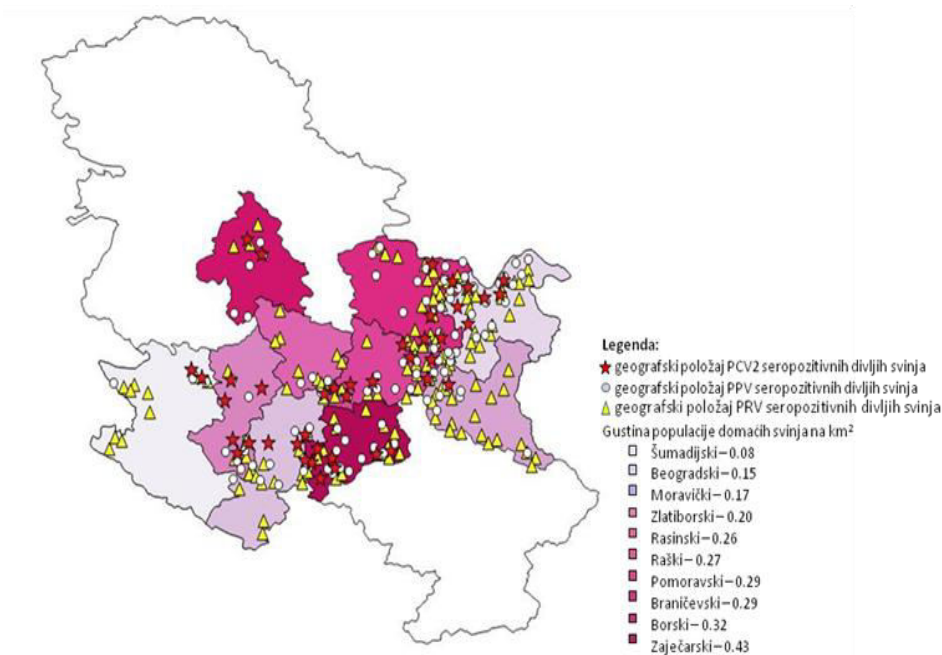
Slaba pozitivna korelacija je utvrđena između gustine populacije domaćih svinja i pojave PPV infekcije ( $r=0,05$ ) i PCV2 infekcije ( $r=0,1$ ) kod divljih svinja, slike 41-43.



Slika 41: Prikaz korelacije između seroprevalencije PPV infekcije i gustine populacije domaćih svinja



Slika 42: Prikaz korelacije između seroprevalencije PCV2 infekcije i gustine populacije domaćih svinja



Slika 43: Geografski prikaz lokacija serološki pozitivnih divljih svinja na Aujeckijevu bolest, PCV2 i PPV infekciju prikazane u odnosu na gustinu populacije domaćih svinja

### 5.3.3. ANALIZA RIZIKA OD PRENOŠENJA BOLESTI SA DIVLJIH NA DOMAĆE SVINJE

Rizik od prenošenja bolesti sa divljih na domaće svinje je procenjen primenom kvalitativne metode po Zepeda Seinu [153].

Analiza je izvršena određivanjem stepena verovatnoće unosa virusa u populaciju domaćih svinja, verovatnoće da domaće svinje dođu u kontakt sa virusom i procene posledica koje bi izazvalo širenje bolesti sa divljih na domaće svinje.

Posledice, s obzirom na to da ispitivane virusne infekcije nisu zoonoze, su samo ekonomske prirode.

#### A – Verovatnoća unosa virusa u populaciju domaćih svinja

Za procenu verovatnoće unosa virusa u populaciju divljih svinja, posmatrana su tri parametra: prevalencija bolesti kod divljih svinja, mogućnost efikasnih kontakata između domaćih i divljih svinja i karakteristika virusa, tabela 35.

Tabela 35: Rizik u odnosu na prevalenciju, indeks broja divljih svinja i gustinu domaćih svinja prikazan po okruzima

Okrug	Prev. MA	Prev. PCV2 Infekcije	Prev. PPV Infekcije	Index broja divljih svinja	Gustina domaćih svinja
Beogradski	S	S	V	Z	V
Borski	V	N	S	V	Z
Braničevski	V	N	V	N	S
Moravički	S	S	V	N	N
Pomoravski	V	S	S	N	S
Rasinski	V	S	V	Z	V
Raški	V	N	S	V	Z
Šumadijski	V	N	S	Z	N
Zaječarski	V	Z	N	V	N
Zlatiborski	S	Z	N	V	Z

## **Prevalencija**

Prevalencija Aujeckijeve bolesti je procenjena kao srednja za beogradski, moravički i zlatiborski okrug i kao visoka u ostalim okruzima.

Prevalencija PCV2 infekcije je procenjena kao zanemarljiva u zaječarskom i zlatiborskom, niska u borskom, braničevskom, raškom i šumadijskom okrugu i srednja u ostalim okruzima.

Prevalencija PPV infekcije je procenjena kao niska za zaječarski i zlatiborski, srednja za borski, pomoravski, raški i šumadijski okrug i visoka za beogradski, braničevski, moravički i rasinski okrug.

## **Kontakt divljih i domaćih svinja**

Ostvarivanjem efikasnih kontakata između domaćih i divljih svinja, omogućena je i razmena patogena. Kontakti divljih i domaćih svinja su u funkciji gustine populacije divljih i domaćih svinja za čije izražavanje se koristi numerička vrednost dobijena deljenjem broja divljih svinja sa brojem domaćih svinja na nivou okruga. Ova vrednost se naziva indeksom broja divljih svinja.

Zanemarljiv indeks broja divljih svinja je procenjen za beogradski, rasinski i šumadijski okrug, nizak za braničevski, moravički i pomoravski okrug, dok je u ostalim okruzima visok.

## **Karakteristike virusa**

Osetljivost virusa u spoljašnjoj sredini je od ključnog značaja za prenošenje virusa sa divljih na domaće svinje, u odsustvu direktnog kontakta među životinjama, tabela 36. Karakteristika PPV i PCV2 je da su veoma otporni u spoljašnjoj sredini, pa je i ova njihova osobina utiče na visok rizik od unošenja virusa u populaciju domaćih svinja.



Pošto je virus Aujeckijeve bolesti srednje otporan u spoljašnjoj sredini, rizik od unošenja ovog virusa u populaciju domaćih svinja, samo na osnovu karakteristika virusa, je srednji.

Tabela 36: Rizik u odnosu na karakteristike virusa

	Preživljavanje virusa	Način prenošenja	RIZIK
<b>PRV</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>S</b>
<b>PPV</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>S</b>
<b>PCV2</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>S</b>

### **B – Verovatnoća izlaganja domaćih svinja virusu**

Verovatnoća da domaća svinja dođe u kontakt sa virusom poreklom od divljih svinja je u funkciji postojanja kontakata među domaćim i divljim svinjama, načina prenošenja virusa i nastanka infekcije, najčešćeg načina širenja kod domaćih svinja i karakteristika samog virusa.

Za izražavanje verovatnoće kontakta divljih i domaćih svinja korišćen je indeks broja divljih svinja, tabela 35.

Ni jedna od ispitivanih bolesti se ne širi aerogeno već je za njihovo prenošenje najefikasniji direktan kontakt zbog čega je rizik povezan sa načinom širenja infekcije okarakterisan kao nizak.

Pored načina širenja bolesti, postojanje prijemčivih životinja je uslov za održavanje infekcije. U tom smislu je korišćena gustina populacije domaćih svinja kao rizik od održavanja unete bolesti u njihovoj populaciji.

Gustina domaćih svinja je najviša u beogradskom i rasinskom okrugu, te je i rizik u funkciji ovog parametra visok. Srednji rizik je procenjen za braničevski i pomoravski, nizak za moravički, šumadijski i zaječarski, a zanemarljiv za borski, raški i zlatiborski.

Osetljivost virusa u spoljašnjoj sredini kao parametar koji omogućava da dođe do infekcije je takođe korišćen u proceni verovatnoće nastanka infekcije kod domaćih svinja, tabela 36.

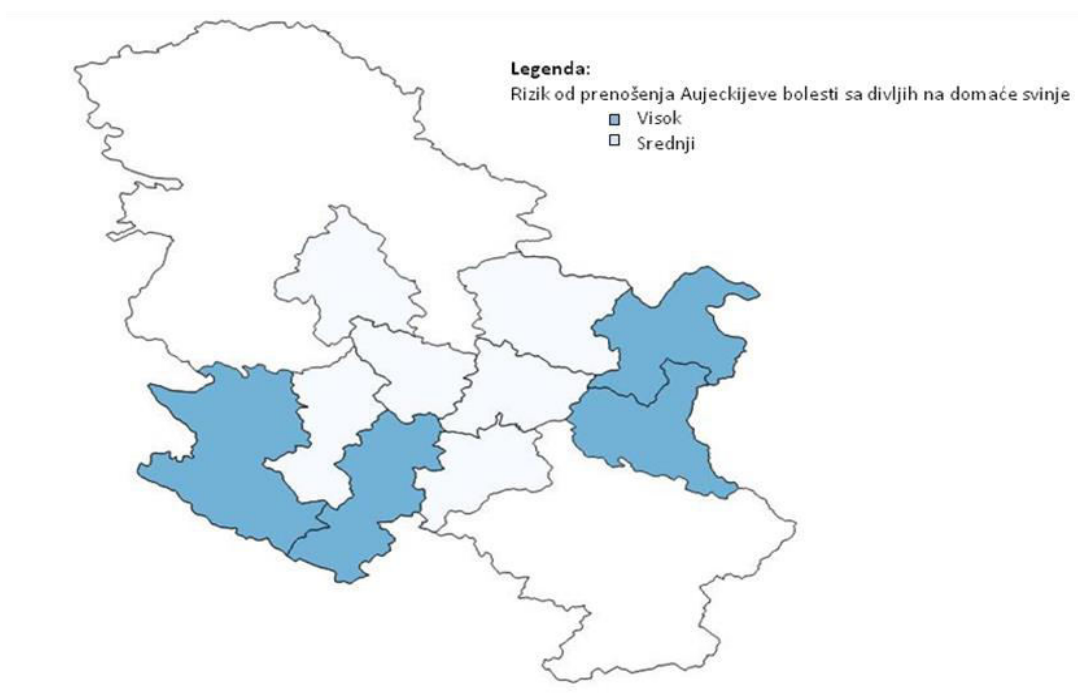
Kombinujući parametre, za svaki okrug i bolest izvršena je analiza rizika, tabela 37.

Tabela 37: Rezultati analize rizika prikazani po okruzima

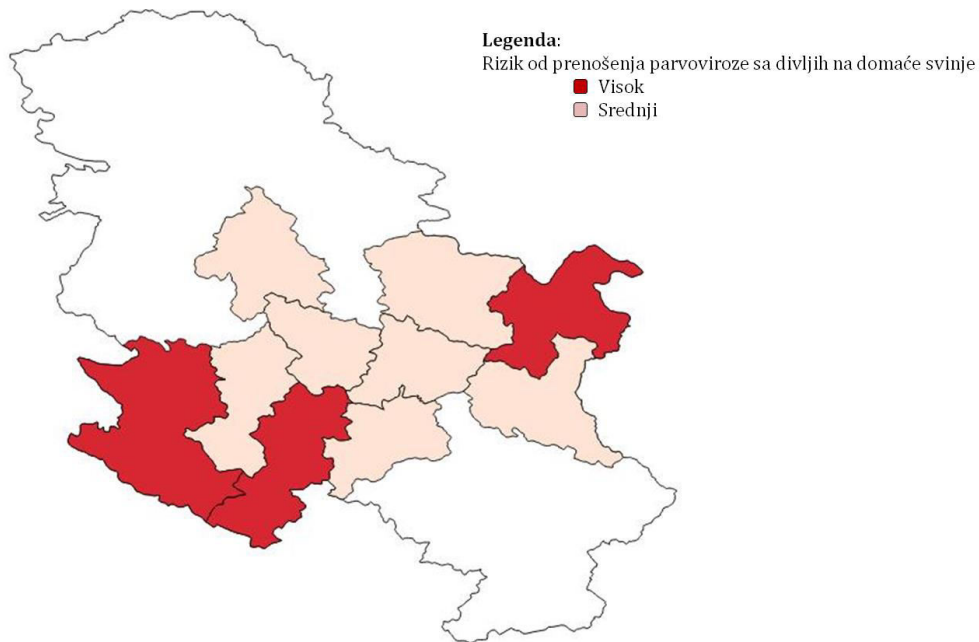
		PARAMETAR	Aujeckijeva bolest			PPV infekcija			PCV2 infekcija					
BEOGRADSKI	A	Prevalencija	S	N	S	S	V	S	S	S	N	S		
		Indeks broja divljih svinja	Z				Z	S		Z	N	S		
	Karakteristike virusa		S			S			S					
	B	Indeks broja divljih svinja	Z	Z	S	S	Z	Z	S	Z	S	S		
Način prenošenja		Z		Z				Z		S				
Gustina domaćih svinja		V	V	V			V	S		V	S			
Karakteristike virusa		S			S			S						
BORSKI	A	Prevalencija	V	V	V	V	S	V	V	N	S	S		
		Indeks broja divljih svinja	V				V	V		V	S	S		
	Karakteristike virusa		S			S			S					
	B	Indeks broja divljih svinja	V	S	S	V	V	S	V	V	S	S		
Način prenošenja		Z		Z				Z		S				
Gustina domaćih svinja		Z	N	Z			N	Z		N	Z		N	
Karakteristike virusa		S			S			S						
BRANIČEVSKI	A	Prevalencija	V	S	S	S	V	S	S	N	N	S		
		Indeks broja divljih svinja	N				N	S		N	N	S		
	Karakteristike virusa		S			S			S					
	B	Indeks broja divljih svinja	N	N	S	S	N	N	S	N	N	S		
Način prenošenja		Z		Z				Z		N				
Gustina domaćih svinja		S	S	S			S	S		S	S		S	
Karakteristike virusa		S			S			S						
ŠUMADIJSKI	A	Prevalencija	V	S	S	S	S	N	S	N	N	S		
		Indeks broja divljih svinja	Z				Z	N		Z	N	S		
	Karakteristike virusa		S			S			S					
	B	Indeks broja divljih svinja	Z	Z	N	S	Z	Z	N	Z	Z	N		
Način prenošenja		Z		Z				Z		Z				
Gustina domaćih svinja		N	S	N			S	N		S	N		S	
Karakteristike virusa		S			S			S						
A	A	Prevalencija	V	S	S	S	S	N	S	S	N	N	S	S

	B	Indeks broja divljih svinja	Z				Z			Z				
		Karakteristike virusa	S				S			S				
		Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	Z	Z			Z	Z			Z	Z		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	N	S			N	S			N	S		
RASINSKI	A	Prevalencija Indeks broja divljih svinja	V	S			V	S		S	N			
		Karakteristike virusa	S				S			S				
	B	Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	Z	Z			Z	Z			Z	Z		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	V	N			V	V			V	V		
POMORAVSKI	A	Prevalencija Indeks broja divljih svinja	V	S			S	N		S	N			
		Karakteristike virusa	S				S			S				
	B	Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	N	N			N	N			N	N		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	S	S			S	S			S	S		
RAŠKI	A	Prevalencija Indeks broja divljih svinja	V	V			S	V		V	S			
		Karakteristike virusa	S				S			S				
	B	Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	V	S			V	S			V	S		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	Z	N			Z	N			Z	N		
ZLATIBORSKI	A	Prevalencija Indeks broja divljih svinja	S	V			N	V		V	S			
		Karakteristike virusa	V				V			V				
	B	Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	V	S			V	S			V	S		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	Z	S			Z	N			Z	N		
ZAJEČARSKI	A	Prevalencija Indeks broja divljih svinja	V	V			N	S		S	S			
		Karakteristike virusa	V				V			V				
	B	Indeks broja divljih svinja Način prenošenja	V	S			V	S			V	S		
		Gustina domaćih svinja Karakteristike virusa	Z	S			Z	S			Z	S		

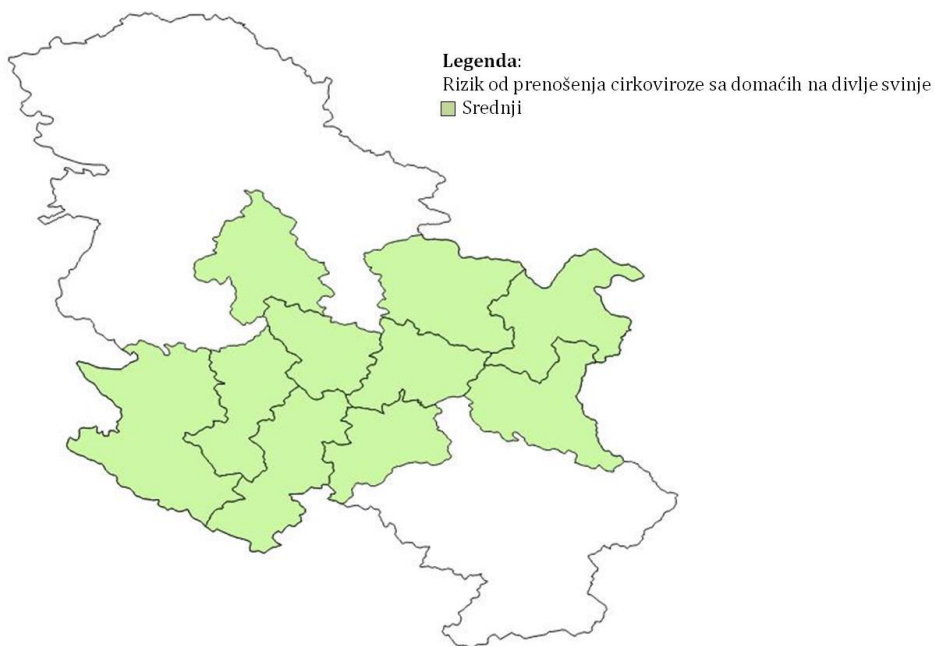
Visok rizik za prenošenje Aujeckijeve bolesti i PPV infekcije je procenjen za borski, raški i zlatiborski okrug. Visok rizik od prenošenja Aujeckijeve bolesti je procenjen za zaječarski okrug. Za ostale okruge i bolesti, rizik je srednji (slike 44-46).



Slika 44: Geografski prikaz analize rizika od prenošenja Aujeckijeve bolesti sa divljih na domaće svinje po okruzima



Slika 45: Geografski prikaz analize rizika od prenošenja PPV infekcije sa divljih na domaće svinje po okruzima



Slika 46: Geografski prikaz analize rizika od prenošenja PCV2 infekcije sa divljih na domaće svinje po okruzima

## 6 DISKUSIJA

Divlja svinja je veoma cenjena divljač u Srbiji. Prema Zakonu o divljači i lovstvu<sup>9</sup>, divlja svinja (*Sus Scrofa*) je autohtona divljač u Srbiji, dok je tradicionalnom lovačkom podelom svrstana u krupnu dlakavu divljač. Ova vrsta je zaštićena lovostajem. Lovna sezona je otvorena za veprove i nazimad do 60 kg od 15. aprila do 28. februara, a za krmače od 01. jula do 31. decembra. Divlje svinje se tradicionalno love u grupnom lovu. Godišnje se u Srbiji odstreli oko 7500 divljih svinja.

Divlja svinja je naša najrasprostranjenija vrsta divljih papkara. Naseljava celu teritoriju Srbije, s tim da su najbrojnije populacije u centralnom delu zemlje. Prema podacima Lovačkog saveza Srbije, u centralnoj Srbiji živi oko 13000 divljih svinja što je oko 70% od ukupnog broja divljih svinja koje naseljavaju teritoriju naše zemlje. Divlje svinje se gaje u otvorenim i ograđenim lovištima, ali ih i tradicionalno drže lovci za treniranje lovačkih pasa.

Divlje svinje se smatraju rezervoarima mnogih bolesti. U Srbiji nema podataka o uticaju divljih svinja na pojavu zaraznih bolesti kod domaćih svinja, a podaci o prisustvu i raširenosti bolesti kod divljih svinja su oskudni. Osim evidentirane seroprevalencije na klasičnu kugu svinja [154], hepatitis E [155] i Aujeckijevu bolest [156] nema drugih pokazatelja o zdravstvenom stanju populacije divljih svinja u Srbiji. Divlje svinje su u Srbiji do 2011. godine u ograđenim lovištima bile vakcinisane protiv klasične kuge svinje. Međutim, zbog nemogućnosti razlikovanja vakcinalnog imuniteta od infekcije, vakcinacija je zabranjena 2011. godine. Vakcina koja je najčešće korišćena za vakcinaciju protiv klasične kuge je bila dvovalentna i sadržala, pored virusa klasične kuge svinja, i atenuiran Bartha soj virusa Aujeckijeve bolesti. Divlje svinje su na taj način bile vakcinisane i protiv Aujeckijeve bolesti.

Gajenje domaćih svinja u Srbiji je najzastupljenija grana stočarstva, sa oko 3500000 grla svinja. Svinjarstvo je najrazvijenije u Vojvodini, a potom u Šumadiji i zapadnoj

---

<sup>9</sup> Službeni glasnik RS, broj 18/10, 26. mart 2010.

Srbiji. Zbog tradicionalnog načina gajenja svinja, udeo porodičnih gazdinstava u proizvodnji je dominantan, ali obrnuto proporcionalan broju svinja: na 80% malih gazdinstava gaji se 41% svinja koja u proseku imaju 4,9 svinja [157].

Za potrebe ovog istraživanja, uzorkovanje divljih svinja je izvršeno na područjima beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog okruga (44.841742 N, 22.791174E). Reljef ovog područja je uglavnom planinski: na zapadu se rasprostiru Dinarske planine, a na istoku Mali Karpati. Reka Morava protiče centralnom Srbijom, od juga prema severu, i uliva se u Dunav koji ograničava severoistok ovog područja. Klima je umereno-kontinentalna sa izraženim lokalnim karakteristikama.

Najveća gustina populacije divljih svinja je utvrđena na teritoriji borskog i zaječarskog okruga koji se nalaze u timočkoj krajini, slika 47, a potom u braničevskom i pomoravskom okrugu.



Slika 47: Reljef područja gde je gustina populacije divljih svinja najveća

Gustina populacije divljih svinja u zaječarskom okrugu je  $0,43/\text{km}^2$ , a u borskom  $0,32/\text{km}^2$  dok je zastupljenost šuma u zaječarskom 36%, a u borskom okrugu 48% teritorije okruga. U zapadnoj Srbiji je ovaj procenat viši (zlatiborski, moravički i raški okrug), ali je gustina divljih svinja niža nego u istočnom delu zemlje. Razlog ovog

opažanja može biti nadmorska visina koja je u timočkoj krajini do 500 m i sa nižim planinama do 1000m, dok je južno od Zapadne Morave i Nišave planinsko područje sa nadmorskom visinom preko 1000 m. Takođe, reljef i konfiguracija terena na području Timočke Krajine, uz dostupne vodene površine za kaljužanje, su tipično stanište divljih svinja. Na ovom području se nalazi Nacionalni park Đerdap i zatalasane Homoljske i Kučajske planine koje su obrasle hrastovim i bukovim šumama i predstavljaju dobar izvor hrane za divlje svinje. Na padinama planine Beljanica, nalazi se i najveće nenaseljeno područje u Srbiji koje odgovara plašljivoj prirodi divljih svinja.

Poredeći broj i gustinu divljih i domaćih svinja u ovim okruzima nije ustanovljena pozitivna korelacija, već su okruzi sa najvećim brojem i gustinom divljih svinja, okruzi u kojima svinjarstvo nije najrazvijenija grana. Na osnovu ovog podatka, može se pretpostaviti da divljim svinjama u Srbiji kao izvor hrane ne služe gazdinstva na kojima se uzgajaju svinje, već da preferiraju život u prirodi, dalje od civilizacije.

U ovom radu praćeno je prisustvo i geografska distribucija virusnih bolesti enzootskog potencijala svinja u periodu 2012-2014. godine. Za svaku godinu odabrano je 200 uzoraka krvnih seruma divljih svinja različitih starosnih kategorija i polova. Takođe, ispitano je i 50 uzoraka divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti na prisustvo samih uzročnika ovih virusnih oboljenja. Najčešći simptomi koji su opisivani od strane lovaca su bili depresija, otežano disanje, usporeno kretanje i gubitak straha od ljudi.

Rezultati ispitivanja su tumačeni u odnosu na starost i pol divljih svinja.

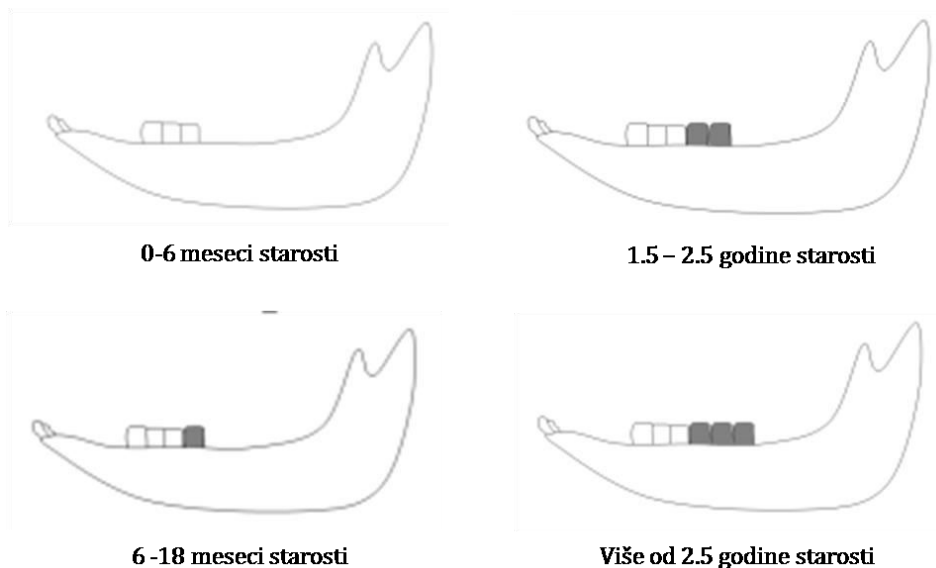
Posedovanje podataka o starosti divljih svinja kada se sprovode serološka ispitivanja je od velikog značaja jer, delimično, mogu ukazati na vreme i dinamiku pojavljivanja bolesti u prethodnim godinama. Cilj je uzorkovati i ispitati najviše uzoraka od mladih divljih svinja starosti od 6 do 18 meseci. U ovom radu, 49% ispitanih divljih svinja je poticalo iz ove ciljne grupe. Podaci dobijeni iz ove kategorije divljih svinja su, posmatrani u funkciji vremena, najkorisniji jer indirektno ukazuju na pojavu bolesti u



prethodnoj godini. Rezultati seroloških analiza kod prasadi stare do 6 meseci ne odlikavaju realno epizootiološko stanje jer se ne može sa sigurnošću utvrditi da li su antitela posledica infekcije ili pasivno stečenog imuniteta. Pozitivni serološki rezultati svinja starijih od 2 godine mogu biti posledica i ranijih infekcija. Ovi podaci nisu pokazatelj trenutnog zbijanja u populaciji divljih svinja već stanja tokom dužeg vremenskog perioda. Najbolji zaključci se izvode kombinovanim tumačenjem rezultata svih starosnih kategorija u funkciji vremena. Može se smatrati da je zaraza enzootska ukoliko su sve starosne kategorije životinja pozitivne i ukoliko nema značajnih promena u prevalenciji posmatrano u dužem vremenskom periodu [158].

Starost divljih svinja u ovom radu je određena na osnovu preporuke SCHEDA ekološkog udruženja (SCHEDA Ecological Associates, inc.), slika 48:

1. 0-6 meseci starosi – 0 stalnih molara,
2. 6-18 meseci starosti – 1 stalni molar,
3. 1,5 – 2,5 godine starosti – 2 stalna molara,
4. Starije od 2,5 godine – 3 stalna molara.



Slika 48: Shema za određivanje starosti divljih svinja na osnovu broja stalnih molara prema preporuci SCHEDA Ecological Associates, inc.

Sama priroda i način života divljih svinja, solitarnih mužjaka i ženki koje žive u matrijarhatu, uslovljava različitu verovatnoću nastanka infekcije kod različitih polova. Kontakti ženki se ostvaruju uglavnom unutar grupa, osim u sezoni parenja kada im se pridružuju mužjaci. Mužjaci, tragajući za ženkama ostvaruju više kontakata sa različitim metapopulacijama, ali manje sa pojedinačnim životinjama. Na taj način, postaju epizootička veza između metapopulacija. Prirodan odnos polova kod divljih svinja je 1:1, te je i odnos uzorkovanih i ispitanih divljih svinja u okvirima ove proporcije. Od ukupnog broja, 52,5% pregledanih divljih svinja je bilo muškog, odnosno 47,5% ženskog pola.

Kao bolesti koje imaju potencijal uspostavljanja enzootije kod divljih svinja okarakterisane su PRRS, Aujeckijeva bolest, PPV i PCV2 infekcija, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija. Za enzootske bolesti kod domaćih svinja dobro su poznati faktori nastanka, kao i sama bolest [159]. Kod divljih svinja malo je poznatih faktora nastanka, a za većinu se pretpostavlja da su patogeneza i sama bolest slični kao kod domaćih.

Dosadašnja iskustva iz intenzivnog načina gajenja domaćih svinja potvrđuju da gustina populacije ima veoma važnu ulogu u nastanku enzootija kod domaćih svinja. Stoga je gustina populacije divljih svinja u ovom radu razmatrana kao jedan od faktora za nastanak i održavanje zaraze kod divljih svinja. Divlje svinje su posmatrane kao rezervoari bolesti i izvor infekcije za domaće svinje, ali nije isključen ni obrnuti smer kada su domaće svinje rezervoari za divlje svinje. Iz tog razloga su blizina, gustina i način gajenja domaćih svinja posmatrani kao faktori nastanka i održavanja bolesti kod divljih svinja. Za bolesti prisutne kod divljih svinja, procenjen je rizik od njihovog prenošenja na domaće svinje.

Na osnovu seroloških i virusoloških ispitivanja, utvrđeno je da **PRRS, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija** nisu prisutne kod divljih svinja sa područja 10 okruga iz centralne Srbije.

Na osnovu podataka Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije, PRRS i influenza svinja su veoma raširene bolesti kod domaćih svinja iz intenzivnog uzgoja. Međutim, kod ekstenzivno gajenih svinja ove bolesti su samo sporadično otkrivane. Budući da je gustina populacije važan faktor održavanja ovih bolesti, ovakva epizootička situacija kod domaćih svinja je upravo posledica načina gajenja svinja. U ekstenzivnom uzgoju, PRRS i influenza svinja nemaju potencijal za uspostavljanje enzootije kao što je to slučaj u intenzivnom uzgoju. Veliki broj životinja na malom prostoru, brz obrt populacije i stalni priliv prijemljivih životinja su karakteristike intenzivnog gajenja svinja koji omogućava stalno cirkulisanje virusa i održavanje enzootskog stanja. U ekstenzivnim uslovima, svinje se gaje uglavnom od marta do novembra, pri čemu nema priliva novih životinja, a direktni kontakti među svinjama su ograničeni.

**Influenca divljih svinja** je u sprezi sa pojavom influence kod divljih ptica. Na područjima gde su izvršena ispitivanja divljih svinja, nalaze se i velika staništa divljih, vodenih ptica (N. P. Đerdap). U ovim područjima, hraneći se leševima ptica ili indirektnim kontaktom, divlje svinje se mogu zaraziti virusom influence. Međutim, naši rezultati ne ukazuju da se to dešavalo u ispitivanom periodu. Jedan od razloga može biti i niska prevalencija kod divljih ptica [160].

**Transmisivni gastroenteritis** duži vremenski period nije dokazan kod domaćih svinja u Srbiji, dok su podaci o raširenosti respiratornog Coronavirusa svinja veoma ograničeni [161]. Pretpostavlja se da PRCV učestvuje u etiologiji respiratornih oboljenja kod domaćih svinja, ali nema laboratorijskih potvrda za ove pretpostavke. Kao i PRRS i influenza svinja, i ovo je bolest intenzivne proizvodnje svinja.

Na osnovu rezultata naših ispitivanja kojima je utvrđeno da PRRS, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija nisu prisutni kod divljih svinja, zaključuje se da domaće svinje, uz visoku prevalenciju ovih bolesti, mogu pod određenim uslovima da predstavljaju izvor infekcije i rezervoare ovih bolesti za divlje svinje. Povoljna okolnost je da su ove bolesti prisutne kod domaćih svinja koje se gaje u intenzivnom uzgoju, a veoma

sporadično kod ekstenzivno gajenih svinja. Biosigurnosne mere koje se primenjuju na farmama sprečavaju širenje infekcija van farmi, na domaće i divlje svinje. Ukoliko bi se ove bolesti pojavljivale kod ekstenzivno gajenih svinja, gde se biosigurnosne mere gotovo i ne sprovode, divlje svinje bi bile pod velikim rizikom da se bolest sa domaćih svinja prenese na njih. Ekstenzivna proizvodnja svinja predstavlja kariku između divljih i domaćih svinja u intenzivnom uzgoju. Kontakt divljih svinja i intenzivne proizvodnje je gotovo nemoguć, dok se kontakt divljih i ekstenzivno gajenih svinja odigrava na dva nivoa – direktnom i indirektnom. Zbog toga je epizootiološka situacija kod divljih svinja približnija situaciji kod ekstenzivno gajenih svinja.

Literaturni podaci pokazuju da su PRRS, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija prisutni u Evropi sa veoma niskom prevalencijom ili su potpuno odsutne bolesti kod divljih svinja [26, 34, 53, 94, 102] što je u skladu sa rezultatima naših ispitivanja.

Ovakva epizootiološka situacija kod divljih svinja je veoma poželjna i treba je očuvati. To se može postići podizanjem svesti vlasnika domaćih svinja o uspostavljanju biosigurnosnih mera kojima se sprečava širenje i unos zaraze na gazdinstvo.

**PPV infekcija** je, na osnovu rezultata ovog rada, enzooska bolest kod divljih svinja. Seroprevalencija iznosi oko 50% u ispitivanom periodu od 2012. do 2014. godine. Na nivo seroprevalencije nemaju presudan uticaj ni pol niti starost divljih svinja. Blagi skok seroprevalencije sa 44% u 2013. na 53% u 2014. godini može biti posledica stalnih fluktuaciji u broju divljih svinja i dužini trajanja maternalnog imuniteta.

Analizirajući stanje po okruzima, utvrđeno je da je seroprevalencija najniža, ispod 20%, u zlatiborskom okrugu. U beogradskom okrugu, prevalencija je najviša i iznosi 100%. Nešto viša u odnosu na prosečne vrednosti je i u moravičkom i borskom okrugu. Na osnovu rezultata po starosnim kategorijama divljih svinja iz zlatiborskog okruga, može se pretpostaviti da je PPV infekcija bolest koja je nedavno uneta u ovo područje jer je u 2012. godini serokonverzija dokazana samo kod kategorije 1,5-2,5 godine starosti. U narednoj, 2013. godini, kod 100% pregledanih svinja iz kategorije 6-18 meseci je došlo do serokonverzije, ukazujući na širenje infekcije kod mladih svinja.

U 2014. godini su specifična antitela dokazana i kod najmlađe kategorije svinja, najverovatnije kao posledica pasivno stečenog, maternalnog imuniteta. Hipoteza da je bolest relativno nova u ovom području objašnjava i relativno nisku prevalenciju u ovom okrugu u odnosu na ostale ispitane okruge. U zlatiborskom okrugu, domaće svinje se uglavnom drže ekstenzivno. Mogući putevi širenja PPV infekcije na divlje svinje iz zlatiborskog okruga su preko ove subpopulacije domaćih svinja ili preko divljih svinja iz susednih okruga, na pr. moravičkog u kojem je seroprevalencija oko 70%.

Iako je pokazano da pol nema uticaj na pojavu PPV infekcije, značajna zastupljenost bolesti kod nerastova pruža mogućnost za prenošenje virusa na velike udaljenosti, posebno u sezoni parenja. Mužjaci su, takođe, epizootiološki važan činilac jer izlučivanje spermom traje kroz duži vremenski period. Moguće je da je upravo polni put prenošenja virusa delimično odgovoran, uz uspostavljenu prirodnu ravnotežu, za odsustvo korelacije između gustine divljih svinja i prevalencije PPV infekcije.

PPV infekcija se kod divljih svinja teško uočava u prirodi. Uobičajeno je da krmače pojedju mrtvorodenu prasid i na taj način uklone tragove. Takođe, moguće je da je incidencija reproduktivnih poremećaja na nižem nivou nego kod domaćih svinja jer se, zbog načina života, primarna infekcija nazimica odigra još pre prvog graviditeta što ih čini imunim na infekcije koje mogu nastati kasnije. Same karakteristike virusa utiču na postojanost ove bolesti kod divljih svinja. Virus je izuzetno stabilan u spoljašnjoj sredini, pa i ako nema direktnog kontakta među životinjama, postoje efikasni indirektni putevi za njegovo prenošenje čak i u dugom vremenskom intervalu.

Rezultati ispitivanja seroprevalencije u periodu od tri godine ukazuju da je PPV infekcija tipična za divlje svinje i da se kod njih održava bez spoljašnjih uticaja. Budući da dovodi do reproduktivnih poremećaja, može se posmatrati i kao prirodni regulator populacije divljih svinja.

Na prevalenciju PPV infekcije nema uticaja ni gustina niti blizina domaćih svinja. U ekstenzivnim uslovima gajenja svinja, uglavnom se drže tovljenici, dok je broj krmača, koje u najvećoj meri privlače divlje svinje, značajno manji. Towljenici su za divlje svinje

atraktivni samo zbog mogućih zajedničkih izvora hrane, ali s obzirom da se gaje od proleća do jeseni kada u prirodi ima dovoljno hrane za divlje svinje, kontakti sa tovljenicima iz ekstenzivne proizvodnje se mogu smatrati sporadičnim i neefikasnim u prenošenju PPV-a.

Čak i u slučaju da se virus, preko ekstenzivno gajenih svinja prenese na intenzivnu proizvodnju, posledice ne bi bile značajne jer su svinje u intenzivnoj farmskoj proizvodnji većinom vakcinisane protiv PPV infekcije, zbog ekonomskog značaja ove bolesti. Vakcinacijom je intenzivna proizvodnja svinja „izolovana“ od ove bolesti.

Divlje svinje kao rezervoari i izvor infekcije za domaće svinje se mogu posmatrati u kontekstu pojave novog tipa virusa kod divljih svinja i/ili ponovnog unošenja virusa kod domaćih svinja. U tom slučaju, rizik koji je u funkciji prevalencije, karakteristika virusa i efikasnih kontakata između domaćih i divljih svinja bio bi srednji do visok (borski, raški i zlatiborski okrug).

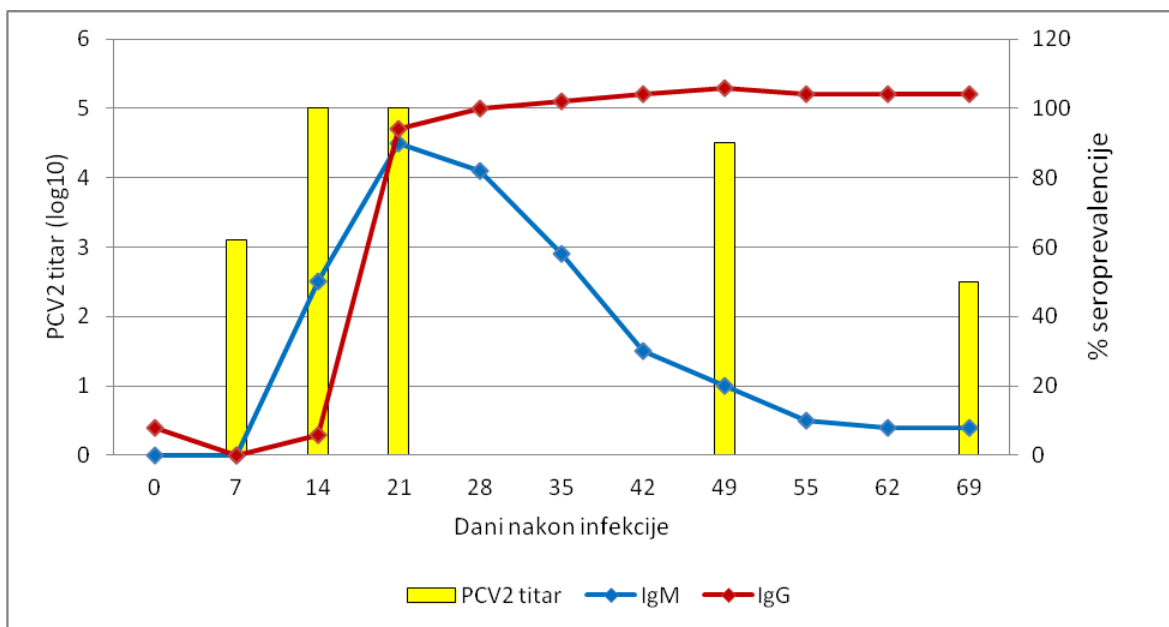
Trenutno, s obzirom na visoku prevalenciju kod domaćih svinja kao posledicu prirodne i veštačke imunizacije, divlje svinje ne poseduju potencijal kojim bi se ugrozilo zdravstveno stanje domaćih svinja. Ova bolest je kod divljih svinja uspostavila prirodnu ravnotežu i ne treba je remetiti veštačkim uticajima.

O sličnoj situaciji kao kod nas, govore i literaturni podaci iz okruženja gde je PPV infekcija prisutna u visokom procentu kod divljih svinja [53, 74, 75, 76, 77].

**PCV2 infekcija** svinja je veoma često oboljenje domaćih svinja. Međutim, na osnovu seroloških ispitivanja u periodu 2012-2014, očigledno je da se bolest nedavno pojavila i raširila kod divljih svinja u područjima gde su ispitivanja vršena.

Seroprevalencija PCV2 infekcije je značajno niža u odnosu na prevalenciju PPV infekcije i Aujeckijeve bolesti, i uz konstantan porast do 22% u 2014. godini. Na osnovu nivoa imunoglobulina klase M i G moguće je proceniti vreme nastanka infekcije (slika 49) [162]. IgM antitela se u cirkulaciji detektuju oko 7. dana od nastanka infekcije da bi posle 21. dana, kada su na najvišem nivou, postepeno opadala i bivala zamenjena IgG antitelima. IgG antitela se u cirkulaciji pojavljuju oko 14. dana

od nastanka infekcije i ostaju na visokom nivou i posle 21. dana. Posle 21. dana, IgM padaju na nivo ispod praga detekcije.



Slika 49: Humoralni imunološki odgovor meren ELISA testom (Ingenasa) nakon eksperimentalne infekcije [162]

Upoređujući vrednosti IgM i IgG antitela, utvrđeno je da je u rasinskom i zlatiborskom okrugu u 2014. godini, u periodu kada su izvršena uzorkovanja, PCV2 infekcija bila aktivna. U istom periodu, u borskom, braničevskom i šumadijskom okrugu infekcija je bila stara 1-2 meseca.

Najviša seroprevalencija PCV2 infekcije je utvrđena u beogradskom i moravičkom okrugu, a najniža u zlatiborskom.

Na osnovu rezultata seroloških ispitivanja, primarna infekcija divljih svinja u zlatiborskom okrugu desila se u 2014. godini kada je registrovana prva serokonverzija kod divljih svinja u ovom okrugu. Negativni serološki rezultati kod svih kategorija svinja u 2012. i 2013. godini pokazuju da je infekcije nije bilo pre 2014. godine. U prilog pretpostavci da je infekcija u zlatiborski okrug uneta tek 2014. godine govori i nalaz aktivne infekcije kod pojedinih divljih svinja iste godine. Pretpostavlja se da su izvor infekcije za divlje svinje iz ovog područja bile domaće svinje kod kojih je PCV2

infekcija veoma prisutna ili divlje svinje iz okolnih okruga gde je seroprevalencija viša, kao što je ustanovljeno u moravičkom okrugu, na pr.

Da se bolest kod divljih svinja pojavila tek nakon što se raširila kod domaćih svinja, pokazuju slični podaci iz šumadijskog okruga: u 2012. godini, serološki odgovor na PCV2 nije dokazan dok je u 2013. seroprevalencija iznosila 10%. Kategorija kod koje je serološki odgovor dokazan su bile odrasle divlje svinje starosti 1,5–2,5 godine. U 2014. godini seroprevalencija je porasla na 20%, s tim da se infekcija raširila i na kategoriju mlađih svinja starih 6-18 meseci. U momentu uzorkovanja divljih svinja u 2014. godini, na osnovu nivoa i odnosa IgG i IgM, infekcija je kod pojedinih divljih svinja bila stara 1-2 meseca.

Na osnovu seroprevalencije, PCV2 infekcija u ostalim okruzima je na stabilnom nivou. Polna predispozicija za pojavu ove bolesti nije utvrđena što je u skladu sa karakteristikama oboljenja. Iako je direktan način širenja bolesti dominantan, nije utvrđena pozitivna korelacija između gustine divljih svinja i seroprevalencije.

Imajući u vidu mogućnost razmene patogena i ulogu divljih svinja kao rezervoara mnogih bolesti, izvršeno je ispitivanje uticaja gustine i prisustva domaćih svinja na pojavu PCV2 infekcije kod divljih svinja. U ovom slučaju je utvrđena blaga pozitivna korelacija koja potvrđuje hipotezu da je smer prenošenja PCV2 sa domaćih na divlje svinje.

Slične rezultate objavili su Goedbloed i sar. [163] koji su ustanovili da pol i socijalni status nemaju uticaj na seroprevalenciju, ali da su starost i heterozigotnost povezani sa nivoom seroprevalencije kod divljih svinja. Starost se objašnjava kumulativno većom verovatnoćom da do infekcije dođe, dok su heterozigoti prirodno otporni na PCV2.

Prvi podaci o PCV2 infekciji kod domaćih svinja u Srbiji objavljeni su 2004. godine [164], mada se bolest, verovatno, pojavila značajno ranije. Pretpostavlja se da je, zbog širenja direktnim kontaktom i odsustva vektora, virusu bio potreban duži vremenski period da se prenese na populaciju divljih svinja. Takođe, utvrđeno je da se PCV2 infekcija i među divljim svinjama sporo širi. Ukoliko bi se uspostavio smer širenja



zaraze od divljih ka domaćim, onda bi divlje svinje mogle postati izvor virusa za nastanak reinfekcija domaćih svinja. Uzevši u obzir karakteristike virusa i infekcije i brojnost populacije divljih i domaćih svinja, procenjen je rizik od nastanka ovakve situacije. Analizom dostupnih parametara, utvrđen je srednji rizik za sve okruge.

Budući da je ova bolest relativno nova za divlje svinje sa ovog područja, neophodno je praćenje njenog daljeg razvoja. Uz to, potrebno je utvrditi da li je, uz eliminaciju izvora od strane domaćih svinja, bolest samoograničavajuća. PCV2 infekcija se može smatrati prirodnim regulatorom broja divljih svinja. Uočeno je da postoji pozitivna korelacija između stepena heterozigotnosti divljih svinja i nalaza antitela protiv PCV2. PCV2 infekcija dovodi do uginuća divljih svinja u populacijama u kojima je mali broj heterozigota [163].

Na osnovu trogodišnjeg ispitivanja, može se smatrati da je PCV2 infekcija sada enzootska bolest kod divljih svinja, ali bez pretnje po zdravstveno stanje domaćih svinja.

Za **Aujeckijevu** bolest je dokazano da su divlje svinje rezervoari virusa koji je uzročnik ove zarazne bolesti [44]. Ranija ispitivanja koja su sprovedena su potvrdila prisustvo Aujeckijeve bolesti kod divljih svinja u Srbiji, uz visoku seroprevalenciju naročito u istočnim delovima zemlje. Lazić i sar. [156] izvestili su o prosečnoj seroprevalenciji kod divljih svinja od 38,21%, uz najveći postotak kod kategorije divljih svinja starijih od 2,5 godine – 46,86%.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je Aujeckijeva bolest kod divljih svinja u centralnoj Srbiji enzootskog karaktera. U trogodišnjem ispitivanju zdravih divljih svinja utvrđeno je da seroprevalencija iznosi preko 50%, uz maksimum u 2013. godini kada je iznosila u proseku 72%. Slično kao i za ostale bolesti, najniža seroprevalencija je utvrđena u zlatiborskom okrugu gde je u 2014. godini iznosila 40%. Prevalencija u ostalim okruzima je značajno viša i stabilna, osim u beogradskom i šumadijskom

okrugu gde se uočava značajan porast seroprevalencije u posmatranom trogodišnjem periodu.

Pojava Aujeckijeve bolesti je u funkciji pola divljih svinja. O ovom fenomenu je ranije izveštavano [48, 165, 166]. U ovom radu je pokazano da postoje značajne razlike u zastupljenosti bolesti kod mužjaka i ženki. Različit način života mužjaka i ženki uslovio je da mužjaci ostvaruju veći broj kontakata sa različitim metapopulacijama divljih svinja, naročito tokom sezone parenja. Svaka metapopulacija ima svojstvenu mikro epizootiološku situaciju koja može biti različita od drugih. Iako ukupan broj ostvarenih kontakata može biti manji, verovatnoća od nastanka infekcije je srazmerna broju ostvarenih kontakata sa različitim metapopulacijama. Sa druge strane, ženke žive u grupama, ostvaruju kontakte unutar svojih i retko se mešaju sa životinjama iz drugih grupa, osim indirektno na izvorštima vode, hrane i sl.

Seroprevalencija Aujeckijeve bolesti je takođe u funkciji starosti divljih svinja: procenat seroprevalencije se povećava sa starošću divljih svinja. Ovo se može objasniti, kao i kod ostalih bolesti, većom verovatnoćom od nastanka infekcije sa dužim životom, ali i karakteristikama samog oboljenja. Herpesvirusna oboljenja odlikuje uspostavljanje latentnog stanja virusa u organizmu tokom kojeg je nekompletiran virus skladišten u jedru nervnih ćelija. Kod domaćih svinja, virus Aujeckijeve bolesti latentno stanje uspostavlja u trigeminalnim ganglijama, dok kod divljih u sakralnim [45]. Svaki stres i lučenje hormona stresa su okidači za prelazak virusa iz latentnog u aktivno stanje i stimulacija imunološkog sistema. Sa dužim životom uvećava se broj stresnih situacija kroz koje divlje svinje svakodnevno prolaze, a samim tim je stimulacija imunološkog sistema jača. Ovo objašnjava viši nivo seroprevalencije kod starijih divljih svinja nego kod mlađih.

Pozitivna korelacija utvrđena je između gustine populacije divljih svinja i seroprevalencije. Moguće je da i za Aujeckijevu bolest, kao za klasičnu kugu svinja i slinavku u šap, važi pravilo o minimalnom broju divljih svinja koji omogućava održavanje bolesti u prirodi. S obzirom da virus Aujeckijeve bolesti nije naročito otporan u spoljašnjoj sredini, to je direktan način prenošenja glavni put širenja virusa.

Da bi se infekcija efikasno širila, očigledno je potreban dovoljan broj životinja koje ostvaruju direktne kontakte.

Međutim, pokazano je da prisustvo i gustina domaćih svinja, nemaju uticaj na pojavu Aujeckijeve bolesti kod divljih svinja. O ovome postoje literaturni podaci koji podržavaju pretpostavku da se Aujeckijeva bolest kod divljih svinja održava i bez prisustva domaćih svinja [166]. Ovakvi rezultati potkrepljuju teoriju da su divlje svinje rezervoari virusa Aujeckijeve bolesti i da služe kao izvor infekcije za domaće svinje.

Rizik od prenošenja na domaće svinje je veći ukoliko se zna da se virus spontano izlučuje u nosnom sekretu krmača do 19 meseci bez vidljivih kliničkih simptoma [167].

Prisustvo Aujeckijeve bolesti kod divljih svinja je poseban problem u zemljama koje pokušavaju da Aujeckijevu bolest iskorene kod domaćih svinja. U Srbiji se na dobrovoljnoj osnovi vrši vakcinacija domaćih svinja protiv Aujeckijeve bolesti, a kako ne postoji plan eradikacije, divlje svinje se u tom kontekstu još uvek ne smatraju pretnjom. Međutim, ukoliko bi se proces eradikacije započeo, poznavajući epizootiološku situaciju kod divljih svinja, seroprevalenciju i karakteristike oboljenja, procenjen je rizik od širenja Aujeckijeve bolesti sa divljih na domaće svinje. Ovaj rizik je u funkciji ostvarivanja kontakata divljih i domaćih svinja, odnosno preduzetih biosigurnosnih mera na farmama domaćih svinja i u funkciji karakteristika samog oboljenja. Visok rizik je procenjen za borski, raški, zaječarski i zlatiborski okrug, dok je za ostale okruge srednji. Očigledno je da su okruzi sa visokim rizikom karakteristični po ekstenzivnom načinu držanja svinja gde su kontakti sa divljim svinjama, na razne načine, najverovatniji.

Ispitivanjem zdravih divljih svinja koje su ulovljene u periodu 2012-2014. godine u cilju procene rizika koji divlje svinje nose kada zaraze uspostave enzootsko prisustvo, utvrđeno je da su okruzi sa dominantno ekstenzivnim načinom gajenja svinja pod najvećim rizikom. Takvi su raški, zlatiborski i borski za Aujeckijevu bolest i PPV

infekciju, odnosno zaječarski za Aujeckijevu bolest. Uz način gajenja svinja, u ovim okruzima, važnu ulogu ima i gustina divljih svinja.

Poznavajući nivo rizika, njime se može upravljati kako bi rizik bio smanjen i kontrolisan. U slučaju ovih okruga, sprečavanje direktnih i indirektnih kontakata sa divljim svinjama, bila bi jedna od mera koje treba hitno primeniti. Ključnu ulogu u ovom procesu imaju vlasnici domaćih svinja čijom edukacijom se postižu dva cilja: smanjuje rizik od širenja bolesti sa divljih na domaće svinje i u obrnutom smeru, sa domaćih na divlje svinje.

Serološkim ispitivanjem krvnih seruma zdravih divljih svinja utvrđeno je prisustvo i vremenska i prostorna distribucija enzootskih virusnih bolesti. Za donošenje pouzdanih zaključaka o načinu širenja, vremenu pojavljivanja i ulogama divljih i domaćih svinja u epizootologiji zaraznih bolesti neophodni su podaci o samim uzročnicima, tipovima, virulenciji i njihovoj evoluciji. Stoga su u ovom radu ispitani i uzorci divljih svinja koje su odstreljene zbog manifestnih znakova bolesti.

Uzorci od 50 bolesnih divljih svinja pregledani su na prisustvo uzročnika virusnih bolesti enzootskog potencijala-PRRS, Aujeckijeva bolest, PPV i PCV2 infekcije, influenza svinja, TGE/PRCV infekcija. Međutim, osim virusa Aujeckijeve bolesti, ni jedan drugi uzročnik nije dokazan. Bolesne divlje svinje poticale su iz borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, raškog i zaječarskog okruga, a virus Aujeckijeve bolesti je dokazan u uzorcima divljih svinja iz braničevskog, pomoravskog, raškog i zaječarskog okruga. Pretpostavlja se da je izbijanje zaraze bio razlog povećane incidencije obolelih svinja u braničevskom i zaječarskom okrugu budući da su izolovani virusi poticali od serološki negativnih divljih svinja. Divlje svinje u pomoravskom i raškom okrugu kod kojih je dokazan genom PRV ne smatraju se aktivno inficiranim već latentno jer su pozitivne svinje bile stare preko 1,5 godine i sa visokim titrom antitela. Takođe, virus nije izolovan na kulturi tkiva što, uz prisustvo antitela, objašnjava pozitivan PCR nalaz odnosno dokazivanje genoma nekompletiranog virusa u latentnom stanju.

Iako su do sada sprovedena ograničena serološka ispitivanja, ni virus niti klinički ispoljena Aujeckijeva bolest nisu opisani kod divljih svinja u Srbiji.

Eksperimentalnim infekcijama utvrđeno je da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod divljih svinja imaju sposobnost adaptacije za vrstu što objašnjava različite kliničke simptome i imunološki odgovor kod divljih i domaćih svinja [168].

Manifestovani klinički simptomi su rezultat virulencije i unete doze virusa, starosti domaćina i njegovog reproduktivnog i imunološkog statusa. Najčešće se uočavaju kod prasadi i krmača. Kategorija divljih svinja koja je najviše pogođena ovom bolešću u našem ispitivanju je bila u uzrastu od 6 do 18 meseci. Klinički simptomi kod ove kategorije svinja koji se najčešće pojavljuju su nespecifični i uključuju depresiju, gubitak apetita, groznicu, kašalj itd. Takođe, patomorfološke promene nisu tipične ili su čak odsutne. Depresija, gubitak straha od ljudi, usporeno kretanje i otežano disanje su bili simptomi koji su uočeni kod obolelih divljih svinja u ovom radu ali, zbog nespecifičnosti, nisu mogli biti povezani ni sa jednom konkretnom bolešću. Ipak, poznata epizootiološka situacija kod divljih svinja omogućava postavljanje sumnje na zaraznu bolest.

Za divlje svinje kod kojih ni jedna od bolesti nije dokazana, pretpostavlja se da su uzrok kliničkih simptoma izazvale druge (ne)infektivne bolesti koje nisu bile predmet ovih ispitivanja.

Za potvrdu virusa Aujeckijeve bolesti kod živih životinja, najpouzdanije je ispitati uzorke nosnih briseva, orofaringealne tečnosti i bioptata tonzila. Od uginulih, najbolji uzorci za dokazivanje virusa su mozak, tonzile [169], slezina i pluća. Virus je moguće izolovati iz vaginalnog sekreta, ejakulata, mleka, urina, rektalnih briseva čak i pre početka kliničkih simptoma [31].

U ovom istraživanju, virus Aujeckijeve bolesti je izolovan iz zbirnih uzoraka slezine i bubrega. Ranije je potvrđeno da se upravo u slezini i bubrezima virus nalazi tokom aktivne infekcije [169]. Wittnam i sar. [170] ipak nisu uspeli da posle eksperimentalne infekcije virus izoluju iz slezine, jetre i medijastinalnih limfnih čvorova, ali su ga dokazali u bubrezima, CNS-u i perifernim limfnim čvorovima.

Pouzdana dijagnostika Aujeckijeve bolesti može biti otežana ukoliko se sprovodi vakcinacija. Postoje dokazi da se virusi iz modifikovanih živih vakcina (MVV) mogu širiti preko oronazalnog sekreta [171] mada su Pol i Terpstra [172] pokazali da vakcinacija živim vakcinama ne utiče na laboratorijsku dijagnostiku ove bolesti. Ipak, pošto se vakcinalni imunogen replikuje u organizmu i izlučuje u spoljašnju sredinu, prenošenje na druge životinje, reverzne mutacije i genetske rekombinacije sa terenskim sojevima virusa se ne mogu isključiti [173].

Virus Aujeckijeve bolesti je izolovan na kulturi tkiva iz 4 od 13 PCR pozitivnih uzoraka. Tri uzorka iz kojih je virus izolovan na kulturi tkiva poticala su od serološki negativnih divljih svinja iz braničevskog okruga, a jedan od serološki negativne divlje svinje iz zaječarskog okruga. Od jedne PCR pozitivne, ali serološki negativne divlje svinje iz braničevskog okruga, virus nije izolovan. Virus nije izolovan iz preostalih 8 PCR i seropozitivnih divljih svinja. Ova razlika u rezultatima izolacije virusa i PCR metode objašnjava se samim karakteristikama metoda, njihovim ograničenjima i prednostima. Prisustvo antigen-antitelo kompleksa, citotoksičnih supstanci, uslovi čuvanja i transporta uzoraka u velikoj meri utiču na uspešnost izolacije virusa. Izolacijom virusa dokazuje se prisustvo vijabilnih virusa u uzorku, za razliku od molekularnih testova kojima se dokazuju samo delovi genoma virusa za šta nije nužno da virus bude "živ". Poznavajući karakteristike primenjenih metoda, pretpostavlja se da izolacija virusa nije bila uspešna kod seropozitivnih divljih svinja zbog prisustva antitela i latentnog stanja virusa. Kvalitet uzoraka je mogući razlog neuspešne izolacije kod dve seronegativne divlje svinje.

Latencija herpesvirusa je intenzivno proučavana. Posle tretmana deksametazonom, virus, koji prelazi u aktivno stanje, je moguće uspešno izolovati iz trigeminalnih ganglija, mandibularnih limfnih čvorova, slezine i tonzila, ali retko iz moždanog stabla, moždanog mosta i olfaktornog lobusa [174]. Suprotno, bez tretmana deksametazona, moguće je dokazati samo genom virusa: kod seropozitivnih svinja, virus je moguće dokazati kod 95,7% životinja [175], najčešće u tonzilama [31].

Izolacija virusa Aujeckijeve bolesti u ovom radu je izvršena na PK15, RK13 i MDBK ćelijskim linijama gde je virus Aujeckijeve bolesti doveo do formiranja sincicijuma. Najveću osetljivost pokazala je ćelijska linija PK15 koja je poreklom od svinja. Svi sojevi virusa su uspešno izolovani na sve tri ćelijske linije uz vremensku razliku pojavljivanja citopatogenog efekta koja se objašnjava različitim poreklom ćelijskih linija i prijemčivošću. Formiranje sincicijuma povezuje se sa patogenošću virusa. Bitsch i sar. [176] su doveli u vezu stvaranje sincicijuma sa visokom patogenošću sojeva kod svinja i goveda, mada ovi autori ne smatraju da je odsustvo sincicijuma uvek povezano i sa atenuacijom virusa.

Genom herpesvirusa je veoma konzerviran i većina gena nije dovoljno varijabilna za filogenetsku analizu visoke rezolucije. Virus Aujeckijeve bolesti ima sporu genetsku evoluciju koja ukazuje da genetski diverzitet u okviru jedne populacije može biti posledica visoke prevalencije [43].

Na osnovu dela ul4 gena, sojevi virusa Aujeckijeve bolesti su svrstani u 5 grupa, obeleženih slovima od A do E. Sojevi izolovani iz domaćih svinja nomadski gajenih pripadaju grupama A i C, sojevi iz klasično gajenih domaćih svinja su u grupi B i D. Grupu E čine sojevi virusa sa istoka, prvenstveno iz Kine [42].

Fonseca i sar. [43] su pokazali, analizirajući druge gene, da se formiraju dve odvojene grupacije, grupa sojeva virusa sa istoka i grupa virusa sa zapada.

U ovom radu, delimične sekvence tri gena (us4, us9 i ul49,5) su korišćene za ispitivanje evolutivnog odnosa i sličnosti između izolovanih sojeva virusa iz divljih i domaćih svinja. Tri gena su odabrana radi povećanja pouzdanosti i verovatnoće otkrivanja sličnosti/razlika među sojevima. Ipak, ukupna udaljenost sojeva virusa Aujeckijeve bolesti iz domaćih i divljih svinja kao i između samih sojeva iz divljih svinja je zanemarljiva. Moguće je da je razlog ovakvog nalaza mali broj sojeva i kratak vremenski period koji bi dozvolio bržu evoluciju virusa, kao i mali broj dostupnih sekvenci ovih gena u banci gena.

Najveće razlike su uočene za us9 gen koji kodira 11kDa protein odgovoran za aksonski transport, a zatim za ul49,5 koji kodira N protein uključen u virusnu morfogenezu i fuziju sa membranom. Analizirajući deo gena za gG sojeva virusa izolovanih iz domaćih i divljih svinja, pokazano je da je ovaj gen najkonzerviraniji u odnosu na ostale ispitane gene. Ipak, određena distanca između sojeva virusa iz divljih i domaćih svinja, i istovetnost sojeva iz divljih svinja, na osnovu tri sekvence, ukazuju na različito poreklo virusa. Mali genetski diverzitet, koji je karakteristika herpesvirusa, je takođe odgovoran za niske "bootstrap" vrednosti na filogenetskim stablima.

Najčešće korišćena vakcina u Srbiji za vakcinaciju domaćih svinja u svom sastavu ima atenuirani Bartha soj. Ova vakcina je poznata po minimalnom izlučivanju divljeg virusa u slučaju da do infekcije dođe, što je čini značajno bezbednijom od inaktivisanih vakcina [177]. Mada su Gielkens i sar. [178] izvestili o dva slučaja gde se za sojeve virusa od obolelih divljih svinja sumnjalo da su poreklom od atenuirane vakcine, oni ne isključuju ni mogućnost da je bolest uzrokovana virulentnim virusom prisutnim kod svinja i pre vakcinacije.

Zbog dugogodišnje vakcinacije divljih svinja, bilo je važno uporediti nukleotidne sekvence između sojeva virusa iz divljih svinja i Bartha soja. Najveća udaljenost od 3,9% je utvrđena za ul49,5 gen, gde Bartha soj sa Kaplan i DUL34 pass sojevima formira posebanu grupu.

Analizom tri delimične sekvence utvrđeno je da su sojevi virusa iz domaćih i divljih svinja veoma slični. Ipak, pretpostavlja se da zbog različitog statusa i načina života divljih i domaćih svinja, virus Aujeckijeve bolesti može evoluirati, ali za praćenje ovog procesa treba odabrati gene koji pokazuju pozitivnu selekciju.

Slične rezultate našima objavili su Keros i sar. [179]. Ovi autori su pokazali da u populaciji domaćih i divljih svinja u Hrvatskoj cirkulišu istovetni sojevi virusa, na osnovu gC sekvence iz 6 domaćih i jedne divlje svinje i da pripadaju grupi A. Takođe,



dokazali su da istovetni sojevi cirkulišu i kod pasa kod kojih je u dva slučaja dokazan virus iz grupe A [180].

Kao i kod seroloških ispitivanja zdravih svinja, veća prevalencija virusa je dokazana kod mužjaka, mada u ovom slučaju razlika nije statistički značajna. Sve divlje svinje, osim jedne iz pomoravskog okruga stare više od 2,5 godine, kod kojih je virus Aujeckijeve bolesti dokazan su bile starosti 6-18 meseci što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača iz Španije gde su najčešći slučajevi otkrivani kod kategorije 4-8 meseci starosti [58]. Ne može se ni isključiti greška jer je 64% bolesnih životinja bilo upravo iz ove kategorije.

Serološki rezultati su pokazali da je kod 56% divljih svinja starih 6-18 meseci utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti. Titri antitela viši od 1:128 utvrđeni su kod divljih svinja iz kategorija 1,5-2,5 i preko 2,5 godine starosti i predstavljaju rezultat višekratnih stimulacija imunološkog sistema reaktivacijom virusa. Niski VN titri ili odsustvo antitela kod PCR pozitivnih divljih svinja ukazuju na infekciju koja se desila neposredno pre uzorkovanja, a ne na reaktivaciju virusa. Verin i sar. [181] su upravo ovo dokazali i izvestili o negativnim serološkim rezultatima kod tek zaraženih svinja. Čak do 45% divljih svinja sa pozitivnim nalazom virusa u tonzilama može biti serološki negativno [165].

Uzevši u obzir virusološke i serološke rezultate, pretpostavlja se da se u trenutku uzorkovanja u braničevskom i zaječarskom okrugu dešavala aktivna infekcija virusom Aujeckijeve bolesti. Dokazi za ovu hipotezu su:

- ✓ Uspešna izolacija virusa Aujeckijeve bolesti iz tkiva divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti (depresija, otežano disanje, usporeno kretanje),
- ✓ Izolovani virusi doveli su do formiranja veoma razvijenog sincicijuma,
- ✓ Odsustvo ili nizak VN titar kod virus pozitivnih životinja i
- ✓ Isključene su druge virusne bolesti koje mogu dovesti do sličnih simptoma.

Sumirajući celokupne rezultate ovog istraživanja, epizootička situacija kod divljih svinja se može smatrati povoljnom. Bolesti koje su enzootske u centralnoj Srbiji su Aujeszkejeva bolest i PPV i PCV2 infekcije. Sve tri bolesti su prirodni regulatori broja divljih svinja, a uz to PCV2 modifikuje i genetsku strukturu populacije favorizujući heterozigote. Povoljna okolnost je i odsustvo bolesti karakterističnih za intenzivnu proizvodnju svinja – PRRS, influenza svinja i TGE/PRCV infekcija.

Iako se divlje svinje smatraju rezervoarima mnogih bolesti od kojih su neke u ovom radu i dokazane, treba raditi na očuvanju ovakvog stanja i očuvanju prirodne ravnoteže koja je između bolesti i divljih svinja očigledno uspostavljena.

## 7 ZAKLJUČCI

1. Na osnovu trogodišnjeg ispitivanja prisustva i seroprevalencije virusnih bolesti enzootskog potencijala kod divljih svinja iz beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog okruga, utvrđeno je da se Aujeckijeva bolest, parvoviroza i cirkoviroza tip 2 enzootski pojavljuju kod divljih svinja.
2. Serološkim ispitivanjem 600 uzoraka krvnih seruma uzorkovanih u periodu 2012-2014. godine, utvrđeno je da su divlje svinje sa područja beogradskog, borskog, braničevskog, moravičkog, pomoravskog, rasinskog, raškog, šumadijskog, zaječarskog i zlatiborskog okruga bile slobodne od PRRS-a, influence svinja i TGE/PRCV infekcije.
3. Serološkim ispitivanjima u trogodišnjem periodu, utvrđeno je da se u zlatiborskom okrugu PCV2 infekcija prvi put pojavila 2014. godine.
4. Istraživanjem faktora vezanih za pojavu bolesti, utvrđena je direktna zavisnost između seroprevalencije Aujeckijeve bolesti i gustine populacije, pola i starosti divljih svinja.
5. Ispitivanjem organa divljih svinja koje su pokazivale znakove bolesti, molekularnim i virusološkim metodama dokazan je virus Aujeckijeve bolesti.
6. Virus Aujeckijeve bolesti je uspešno izolovan na ćelijskim linijama PK15, MDBK i RK13. U ovom ispitivanju PK15 je bila najosetljivija ćelijska linija za izolaciju virusa Aujeckijeve bolesti iz organa divljih svinja.
7. Filogenetskom analizom tri gena virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih od divljih svinja, utvrđena je sličnost sa sojevima virusa iz domaćih životinja, ali različito poreklo virusa.

8. Filogenetskom analizom, utvrđeno je da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani iz divljih svinja ne potiču od vakcinalnog Bartha soja.
9. Na osnovu rezultata seroloških, molekularnih i virusoloških ispitivanja, utvrđeno je da je Aujeckijeva bolest bila uzrok povećane incidencije bolesnih divljih svinja u braničevskom i zaječarskom okrugu.
10. Na osnovu podataka o seroprevalenciji, gustini populacija divljih i domaćih svinja i karakteristika virusa, utvrđen je visok rizik od širenja Aujeckijeve bolesti sa divljih na domaće svinje za raški, zlatiborski i borski okrug.
11. Na osnovu podataka o seroprevalenciji, gustini populacija divljih i domaćih svinja i karakteristika virusa, utvrđen je visok rizik od širenja PPV infekcije sa divljih na domaće svinje u zaječarskom okrugu.
12. Na osnovu rezultatata trogodišnjih ispitivanja, utvrđeno je da je epizootička situacija kod divljih svinja za Aujeckijevu bolest, PPV i PCV2 infekciju stabilna, a za PRRS, influencu svinja i TGE/PRCV infekciju povoljna.

## 8 LITERATURA

1. Meijaard, E., d'Huart, J. P. and Oliver, W. L. R. (2011): Family *Suidae* (Pigs). Handbook of the mammals of the world, 2. edn. Hoofed Mammals. Lynx Edicions, Barcelona. 248-292.
2. Mayer, J. J. and Lehr Brisbin, J. R. (1991): Wild Pigs In the United States: Their History, Comparative Morphology, and Current Status. Published by University of Georgia Press, Athens, GA.
3. Porter, V. (1993): Pigs: A Handbook to the Breeds of the World, Helm Information, East Sussex
4. McFee, A. F., Banner, M. W. and Rary, J. M. (1966): Variation in chromosome number among European wild pigs. *Cytogenetics*. 5: 75-81.
5. Dobson, M. (1998): Mammal distributions in the western Mediterranean: the role of human intervention. *Mammal Review*. 28 (2): 77-88.
6. Boitani, L., Trapanese, P., Mattei, L. and Nonis, D. (1995): Demography of a wild boar (*Sus scrofa*, L.) population in Tuscany, Italy. *Gibier Faune Sauvage*. 12: 109–132.
7. Bratton, S. P. (1975): The effect of Wild Boar, *Sus scrofa*, on Gray Beech Forest in the Great Smokey Mountains. *Ecology*. 56 (6): 1356-1366.
8. Spitz F. (1986): Current state of the knowledge of wild boar biology. *Pig News Information* 7: 171-175.
9. Schley, L. and Roper, T. J. (2003): Diet of wild boar, *Sus scrofa*, in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review*. 33 (1): 43-56.
10. Genov, P. (1981): Food composition of wild boar in north-eastern and western Poland. *Acta Theriologica*. 26: 185-205.
11. Dardaillon, M. (1987): Seasonal Feeding Habits of the Wild Boar in a Mediterranean Wetland, the Camargue (Southern France). *Acta Theriologica*. 32(23): 389-401.
12. Boitani, L., Mattei, L., Nonis, D. and Corsi F. (1994): Spatial and activity patterns of wild boars in Tuscany, Italy. *Journal of Mammalogy*. 75 (3): 600-612.

13. Weiler, U., Claus, R., Dehnhard, M. and Hofacker, S. (1996): Influence of the photoperiod and a light reverse program on metabolically active hormones and food intake in domestic pigs compared with a wild boar. *Canadian Journal of Animal Science*. 76: 531–539.
14. Bywater, K. A., Apollonio, M., Cappai, N. and Stephens, K. A. (2010): Litter size and latitude in a large mammal: the wild boar, *Sus scrofa*. *Mammal Review*. 40(3): 212–220.
15. Massei, G. (1995): Feeding ecology, home range and habitat use by wild boar in a Mediterranean coastal area. PhD thesis, University of Aberdeen.
16. Spitz, F. and Janeau, G. (1990): Spatial strategies: an attempt to classify daily movements of wild boar. *Acta Theriologica*. 35: 129-149.
17. Sáez-Royuela, C. and Tellería, J. L. (1986): The increased population of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Europe. *Mammal Review*. 16: 97–101.
18. Andrzejewski, R. and Jezierski, W. (1978): Management of a Wild Boar Population and its Effects on Commercial Land. *Acta Theriologica*. 23(19): 309—339.
19. Kaden V. (1998): The situation of classical swine fever in wild boars in the European Community and selected aspects of disease transmission. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 111: 201-207.
20. Anonymus (2015): African swine fever. *EFSA Journal*. 13 (7): 4163.
21. World Organisation for Animal Health (OIE), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015. OIE Terrestrial Manual 2015. Chapter 2.8.7., World Organisation for Animal Health, Paris, France. 2015.
22. Ohlinger, V. PRRS/Blue ear disease. In: Meredith, M. Editor. SIRS monthly newsletter. Cambridge: Pig Disease Information Center; December 1992.
23. Meulenber, J. J. M., Hulst, M. M., De Meijer, E. J. (1993): Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*. 192: 62-72.
24. Plagemann, P. G. W. (2003): Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Origin Hypothesis. *Emerging Infectious Diseases*. 9 (8): 903–908.

25. Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P. and Faaberg, K. S. (1999): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of Virology* 73: 270–280.
26. Ruiz-Fons F. PRRS syndrome. In: Gavier-Widen, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Wiley-Blackwel, 2012.
27. Zimmerman, J. J., Yoon, K.-J., Wills, R. W., Swenson, S. L. (1997): General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Veterinary Microbiology*. 55: 187-196.
28. Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Hines, R. J., Nelson, J. K., Swenson, S. L., Zimmerman, J. Z., Chase, C. C. L., Yaeger, M. J., Benfield, D. A. (1995): Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 7 (4): 456-464.
29. Yoon, I. J., Joo, H. S., Christianson, W. T., et al (1993): Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with PRRS virus. *Swine Health and Production*. 1 (4): 50
30. Will, R., Zimmerman, J., Yoon, K. J., et al. PRRS virus-A persistent infection. In: *Proc 2nd Intl Symp PRRS, Copenhagen*. 1995:19.
31. Murphy, A. F., Gibbs, E. P. J, Horzinek, C. M. and Studdert, J. M. *Veterinary Virology*. 3<sup>rd</sup> edn. London: Academic Press, UK, 1999.
32. Feitsma, H., Grooten, H. J., Van Schie, F. W. and Colenbrander, B. The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction: 23-27 August 1992*. The Hayes, The Netherlands: Elsevier. 1992:1710–1712.
33. Cho, J. G. and Dee, S. A. (2006): PRRS Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*. 66 (3): 655-662.
34. Albina, E., Mesplède, A., Chenut, G., Le Potier, M. F., Bourbao, G., Le Gal, S. and Leforban, Y. (2000): A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*. 77 (1-2): 43-57.

35. Montagnaro, S., Sasso, S., De Martino, L., Longo, M., Iovane, V., Ghiurmino, G., Pisanelli, G., Nava, D., Baldi, L., and Pagnini, U. (2010): Prevalence of Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 46 (1): 316–319.
36. Roic, B., Cajavec, S., Toncic, J., Lipej, Z., Mihaljevic, Z., Jemersic, L., Madic, M., Lojkic, M. and Cac Z. Serological evidence of reproductive and respiratory síndrome virus (PRRSV) in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. In: IPVS Congr, Durban, 29.
37. Albina, E. (1997): Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Veterinary Microbiology*. 55: 309-316.
38. Meng, X. J., Lindsay, D. S. and Sriranganathan, N. (2009): Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 27; 364 (1530): 2697–2707
39. Kluge, J. P., Beran, G. W., Hill, H. T. and Platt, K. B. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor, D. J. Editors. *Diseases of Swine*, 8<sup>th</sup> Edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1999. 233-246.
40. Muller, T. F., Teuffert, J., Zellmer, R. and Conraths, F.J. (2001): Experimental infection of European wild boars and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence. *American Journal of Veterinary Research*. 62: 252-258.
41. Klupp, B. G., Hengartner, C. J., Mettenleiter, T. C. and Enquist, L. W. (2004): Complete, annotated sequence of the Pseudorabies Virus genome. *Journal of Virology*. 78: 424–440.
42. Fonseca, A., Camargos, M. F., Sales, M. L., Heinemann, M. B., Leite, R. C. and Reis, J. K. P. (2012): Pseudorabies virus can be classified into five genotypes using partial sequences of UL44. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43 (4): 1632–1640.
43. Fonseca, A., Sales, E. B., Heinemann, M. B., Jenner, K. P. and Reis, J. K. P. (2014): Molecular Phylogeny of Suid Herpesvirus 1. *ISRN Virology*. 2014. doi:10.1155/2014/463173.
44. Herrmann, G., Heppner, B. and Ludwig, H. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections group into four genome types. In: Wittmann, G.,



Gaskell, R. M. and Rziha, H. J. Editors. Latent herpesvirus infections in veterinary medicine. Dordrecht, Martinus Nijhoff. 1984. 387-401.

45. Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E. and Hengartner, C. J. (2005): Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 462–500.

46. Pesjak, Z. K. and Truszczynsky, M. Aujeszky's disease (Pseudorabies). In: Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. Editors. *Diseases of Swine*, 9<sup>th</sup> Edn. Oxford: Blackwell Science, UK. 2006. 419–433.

47. Van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L., Moormann, R. J., Berns, A. J. (1990): Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary Microbiology*. 23: 85-101.

48. Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Hofle, U., Acevedo, P., Villanua, D., Fernandez-De-Mera, I. G., Martin, M. P. and Gortazar, C. (2005): Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. *Veterinary Record*. 156: 408–412.

49. Closa-Sebastià, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G. and Marco, I. (2011): Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research*. 57: 977–981.

50. Lari, A., Lorenzi, D., Nigrelli, D., Brocchi, E., Faccini, S., Poli, A. (2006): Pseudorabies virus in European wild boar from Central Italy. *Journal of Wildlife Disease*. 42: 319–324.

51. Köppel, C., Knopf, L., Ryser, M. P., Miserez, R., Thür, B. and Stärk, K. D. C. (2007): Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. *European Journal of Wildlife Research*. 53: 212–220.

52. Zupancic, Z., Jukic, B., Lojkic, M., Cac, Z., Jemersic, L. and Staresina, V. (2002): Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 49: 253–256.

53. Vengust, G., Valencak, Z. and Bidovec, A. (2006): A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of veterinary medicine, B, Infectious diseases and veterinary public health*. 53: 24–27.
54. Szweda, W., Lipowski, A., Ciecierski, H., Zalewski, K. and Pirus, T. (1998): European wild boar (*Sus scrofa* L.) as a reservoir of Herpesvirus suis 1. *Medycyna Weterynaryjna*. 54: 541–544.
55. Kukushkin, S., Baborenko, E., Baybikov, T., Mikhalishin, V. and Domskiy, I. (2009): Seroprevalence of antibodies to main porcine infectious pathogens in wild boar in some regions of Russia. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. 5: 147–152.
56. Elbers, A. R. W., Dekkers, L. J. M., Van Der Giessen, J. W. B. (2000): Sero-surveillance of wild boar in the Netherlands, 1996–1999. *OIE Scientific and Technical Review*. 19: 848–854.
57. Anonymus. Surveillance of zoonotic and other animal disease agents in Sweden 2010, The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. 2010. SVA:s rapportserie 22 ISSN 1654-7098.
58. Gortazar, C., Vicente, J., Fierro, Y., Leon, L., Cubero, M. J., Gonzalez, M. (2009): Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 969: 210-212.
59. Capua, I., Casaccia, C., Calzetta, G. and Caporale, V. (1997): Characterization of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*. 51: 143-149.
60. Mengeling, W. L., Lager, K. M. and Vorwald, A. C. (2000): The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 199-210.
61. Hesse R. A., Tribble, B. R. and Rowland, R. R. Parvoviridae and Circoviridae. In: McVey, D. S., Kennedy, M. and Chengappa, M. M. Editors. *Veterinary Microbiology*. 3<sup>rd</sup> edn. John Wiley & Sons Inc. 2013. 353 – 363.

62. Truyen, U. and Streck, A. F. Porcine parvovirus. In: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K. and Stevenson, G. Editors. Diseases of Swine. 10<sup>th</sup> edn. Oxford: John Wiley & Sons Inc; 2012. 447-455.
63. Cságola, A., Lőrincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I. and Tuboly, T. (2012): Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. Archives of Virology. 157 (6): 1003-1010.
64. Bergeron, J., Hérbert, B. and Tijssen, P. (1996): Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. Journal of Virology. 70: 2508-2515.
65. Burgess, G. W. Porcine parvovirus infection. Australian Bureau of Animal Health; 1980.
66. Ni, J., Qiao, C., Han, X., et al. (2014): Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. Virology Journal. 11: 203.
67. Szelei, J., Zadori, Z. and Tijssen P. Porcine parvovirus. In: Kerr, J. R., Cotmore, S. F., Bloom, M. E., Linden, R. M., Parrish, C. R. Editors. Parvoviruses. 1<sup>st</sup> edn. London: Hodder Arnold Publication; 2006. 435-446.
68. Decaro, N., Buonavoglia, C., Ryser-Degiorgis, M. P. and Gortázar C. Parvovirus Infections. In: Gavier-Widen, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe. Wiley-Blackwell, 2012.
69. Paul, P. S., Mengeling, W. L. and Brown T. T. (1979): Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. Infection and Immunity. 25: 1003-1007.
70. Zeeuw, E. J. L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H. J. and Truyen, U. (2007): Study of the virulence and crossneutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. Journal of General Virology. 88: 420-427.

71. Thacker, B. J., Joo, H. S., Winkelman, N. L., Leman, A. D. and Barnes, D. M. (1987): Clinical, virologic, and histopathologic observations of induced parvovirus infection in boars. *American Journal of Veterinary Research*. 48:763-766.
72. Zhang, C. F., Song, C. P., Chen, C. M., Cui, S. J. and Miao, L. F. (2010): Reproductive failure in wild boars associated to porcine parvovirus infection and in vivo and in vitro characterization of the causal isolate. *Tropical Animal Health and Production*. 42 (8): 1611-1613.
73. Kim, J., Ha, Y. and Chae, C. (2006): Potentiation of porcine circovirus 2-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus is associated with excessive production of tumor necrosis factor-alpha. *Veterinary Pathology*. 43 (5): 718-725.
74. Lutz, W. and Wurm, R. (1996): Serological investigations to demonstrate the presence of antibodies to the viruses causing porcine reproductive and respiratory syndrome, Aujeszky disease, hog cholera, and porcine parvovirus among wild boar (*Sus scrofa*, L, 1758) in Northrhine-Westfalia (Germany). *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft*. 42: 123-133.
75. Mignone, W., Ercolini, C., Perruchon, M. and Poggi, M. (1995): Stato sanitario dei cinghiali selvatici (*Sus scrofa*) in Liguria: Indagini sierologiche. *BIPAS* 12: 69-71.
76. Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., U. Hofle, U., Villanua D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V. and Gortazar, C. (2006): Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*. 65: 731-743.
77. Roic, B., Cajavec, S., Toncic, J., Madic, J., Lipej, Z., Jemersic, L., Lojkic, M., Mihaljevic, Z., Cac, Z., and Sostaric B. (2005): Prevalence of antibodies to porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*. 41: 796- 799.
78. Firth, C., Charleston, M. A., Duffy, S., Shapiro, B. and Holmes, E. C. (2009): Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. *Journal of Virology*. 83 (24): 12813-12821.

79. Soria, S. J. and Joaquim Segalés, J. (2012). Updating on the epidemiology of PCV2 and implications. [https://www.pig333.com/circovirosis/updating-on-the-epidemiology-of-pcv2-and-implications\\_6619](https://www.pig333.com/circovirosis/updating-on-the-epidemiology-of-pcv2-and-implications_6619)
80. Allan, G. M. and Ellis, J. A. (2000): Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 3–14
81. Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B. W., Teo, G. C. *Circoviridae*. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. Editors. *Virus taxonomy: Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego. 2005. 327-334.
82. Fenaux, M., Halbur, P. G., Gill, M., Toth, T. E. and Meng, X. J. (2000): Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCRrestriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2494-2503.
83. Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D. et al. (1998): Detection of a Novel Strain of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (9): 2535-2541.
84. Allan, G. M., Phenix, K. V., Todd, D. and McNulty, M. S. (1994): Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine*. B41: 17–26.
85. Lorincz, M., Cságola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dán, A. and Tuboly, T. (2010): Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*. 58 (2): 265-268.
86. McIntosh, K. A., Harding, J. C. S., Ellis, J. A. and Appleyard, G. D. Nested PCR detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen collected from naturally infected boars. In: Proc Intern Conf “Animal Circoviruses and Associated Diseases”, Belfast, UK. 2005. 93.

87. Segales, J. (2012): Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*. 164: 10–19.
88. Sarli, G., Mandrioli, L., Laurenti, M., Sidoli, L., Cerati, C., Rolla, G. and Marcato, P. S. (2001): Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology Immunopathology*. 83: 53-67.
89. Segales, J., Allan G. M. and Domingo, M. Porcine Circoviruses. In: Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J. and Stevenson, G. W. Editors. *Diseases of Swine*, 10<sup>th</sup> edn. John Wiley & Sons Inc; 2012. 353 - 363.
90. Rodriguez-Arriola, G., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A., Balasch, M., Planaduran, J., Casal, J. and Domingo, M. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*. 63: 354–357.
91. Porter, R. S. and Kaplan, J. L. (2011): *The Merck manual of diagnosis and therapy*. Whitehouse Station, N.J: Merck Sharp & Dohme Corp.
92. Cságola, A., Kecskeméti, S., Kardos, G., Kiss, I. and Tuboly, T. (2006): Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology*. 151: 495–507.
93. Toplak, I., Grom, J., Hostnik, P. and Barlic-Maganja, D. (2004): Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Veterinary Record*. 155: 178–180.
94. Sedlak, K., Barbova, E. and Machova, J. (2008): Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*. 44: 777-780.
95. Sanchez, R., Nauwynck, H. and Pensaert, M. (2001): Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. *Proc. ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates*. St.Malo (France). 122.

96. Reiner, G., Bronnert, B., Hohloch, C., Fresen, C., Haack, I., Willems, H. and Reinache, M. (2010): Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Veterinary Microbiology*. 145: 1-8.
97. Todd, D. and Gortázar C. *Circovirus Infections*. In: Gavier-Widen, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Wiley-Blackwell, 2012.
98. Díez-Delgado, I., Boadella, M., Martín-Hernando, M. P. et al. (2014): Complex Links between Natural Tuberculosis and Porcine Circovirus Type 2 Infection in Wild Boar. *BioMed Research International*, doi:10.1155/2014/765715
99. Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Janczewski, T. A. and Fanning, T. G (2001): Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 356:1829–1839.
100. Olsen, C. W., Brown, I. H., Easterday, B. C. and Van Reeth, K. *Swine Influenza*. In: Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D. J. Editors. *Diseases of Swine*. 8<sup>th</sup> edn. Ames, Iowa USA: Iowa State University Press; 1999. 469-483.
101. Brown, I. H. (2013): History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 370: 133-146.
102. Reperant, L. A., Osterhaus, A. D. M. E. and Kuiken, T. *Influenza Virus Infections*. In: Gavier-Widen, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Wiley-Blackwell, 2012.
103. World Organisation for Animal Health (OIE), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015*. OIE Terrestrial Manual 2015. Chapter 2.3.4., World Organisation for Animal Health, Paris, France, 2015.
104. Matthew, R., Sandbulte, A. R., Spickler, P. K., Roth, A. (2015): Review: Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*. 3 (1): 22-73.
105. Hotea, I., Imre, M., Dărăbuș, G., Pascu, C., Mariș, C., Grema, C. and Herman, V. (2015): Seroprevalence of Toxoplasmosis and Swine Influenza in Wild Boars. *Scientia Parasitologica*. 16 (1-2): 20-27.

106. Foni, E., Garbarino, C., Chiapponi, C., Baioni, L., Zanni, I. and Cordioli, P. (2013): Epidemiological survey of swine influenza A virus in the wild boar population of two Italian provinces. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 4: 16-20.
107. Kaden, V., Lange, E., Starick, E., Bruer, W., Krakowski, W. and Klopries, M. (2008): Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Veterinary Microbiology*. 131 (1-2): 123-132.
108. Zell, R., Scholtissek, C. and Ludwig, S. Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. In: Richt, J. and Webby, R. Editors. *Swine Influenza*. Springer. 2013. 29-55.
109. Saif, L. J. and Wesley, R. D. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor, D. J. Editors. *Diseases of Swine*. 8<sup>th</sup> edn. Ames, Iowa USA: Iowa State University Press; 1999. 295-325.
110. Brown, I. and Cartwright, S. (1986): New porcine coronavirus?. *Veterinary Record*. 119: 282-283.
111. Batista, E. R., Valle, M. B. and Martell, A. B. (2005): Transmissible Gastroenteritis of the Pig: A challenge for the Pig Industry. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. VI. 7.
112. Saif, L. and Sestak, K. Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus. In: Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S. and Taylor, D. J. Editors. *Diseases of swine*. Oxford Blackwell Publishing, 2006. 489-516.
113. Wesley, R. D., Woods, J. D., McKean, M. K. Senn and Y. Elazhary. (1997): Prevalence of coronavirus antibodies in Iowa swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 305-308.
114. Miyazaki, A., Fukuda, M., Kuga, K., Takagi, M. and Tsunemitsu, H. (2010): Prevalence of Antibodies against Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus among Pigs in Six Regions in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 943-946.



115. Pritchard, G. C., Paton, D. J., Wibberley, G. and Ibata, G. (1999): Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Veterinary Record*. 616-618.
116. Chae, C., et al. (2000): Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *The Veterinary Record*. 606- 608.
117. Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G. and Pensaert, M. B. (2008): Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record*. 307-310.
118. Saif, L. Coronaviridae. In: McLachlan, N. J. and Dubovi, E. J. Editors. *Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier Inc., 2011. 393-413.
119. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S. and Hartigan, P. J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd., 2011.
120. McClurkin, A. W., Stark, S. L. and Norman, J. O. (1970): Transmissible gastroenteritis (TGE) of swine: The possible role of dogs in the epizootiology of TGE. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 34: 347.
121. Pilchard, E. I. (1965): Experimental transmission of transmissible gastroenteritis virus by starlings. *American Journal of Veterinary Research*. 26: 1177-1179.
122. Bohl, E. H. and Saif, L. J. (1975): Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infection and Immunity*. 11 (1): 23-32.
123. Gelberg, H. B. Alimentary system - Transmissible gastroenteritis. In: McGavin, M. D. and Zachary, J. F. Editors. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4<sup>th</sup> edn. Mosby-Elsevier, St. Louis, MO. 2007. 375.
124. Paton, D. J., Saif, L. J. and Levings, R. L. Transmissible gastroenteritis. In: OIE Standards Commission. *OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 3<sup>rd</sup> edn. 1996. 488-495.

125. Gavier-Widén, D., Ryser-Degiorgis, M. P., Decaro, N. and Buonavoglia, C. Coronavirus Infections. In: Gavier-Widén, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Wiley-Blackwell, 2012.
126. Kaden, V., Lange, E. and Hänel, A. (2009): Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *European Journal of Wildlife Research*. 55 (2): 153.
127. Hälli, O., Ala-Kurikka, E., Nokireki, T., Skrzypczak, T., Raunio-Saarnisto, M., Peltoniemi, O. A. and Heinonen, M. (2012): Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *Veterinary Journal*. 194 (1): 98–101.
128. Ruiz-Fons, F., Segalés, J. and Gortázar, C. (2008): A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir rôle. *Veterinary Journal*. 176 (2): 158-169.
129. Gortazar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K. and Vicente, J. (2007): Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*. 53: 241-256.
130. Moore, N. (2004): *The Ecology and Management of Wild Boar in Southern England*. Department for Environment, Food and Rural Affairs, Project Report VC0325, Defra, London.
131. Peche, R. P. and Hone, J. (1988): A model of the dynamics and control of an outbreak of foot and mouth disease in feral pigs in Australia. *Journal of Applied Ecology*. 25: 63–78.
132. Laddomada, A. (2000): Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Veterinary Microbiology*. 73: 121-130.
133. Kramer-Schadt, S., Revilla, E., Wiegand, T. and Grimm, V. (2007). Patterns for parameters in simulation models. *Ecologica Modelling*. 204: 553–556.
134. Gortazar, C., Diez-Delgado, I., Barasona, J. A., Vicente, J., De La Fuente, J. and Boadella, M. (2014): The Wild Side of Disease Control at the Wildlife-Livestock-Human Interface: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 1:27.

135. Pol, F., Rossi, S., Mesplède, A., Kuntz-Simon, G. and Le Potier, M. F. (2008): Two outbreaks of classical swine fever in wild boar in France. *Veterinary Record*. 162: 811–816.
136. Boklund, A., Goldbach, S. G., Uttenthal, A. and Alban, L. (2008): Simulating the spread of classical swine fever virus between a hypothetical wildboar population and domestic pig herds in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*. 85: 187–206.
137. Elbers, A. R. W., Dekker, A. and Dekkers, L. J. M. (2003): Serosurveillance of wild deer and wild boar after the epidemic of foot-and-mouth disease in the Netherlands. *Veterinary Record*. 153: 678-681.
138. Anonymus (2012): Scientific Opinion on foot-and-mouth disease in Thrace. *EFSA Journal*. 10 (4): 2635.
139. Laddomada, A., Patta, C., Oggiano, A., Caccia, A., Ruiu, A., Cossu, P. et al. (1994): Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: a serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. *Veterinary Record*. 134: 183–187.
140. Gallardo, M. C., De la Torre Reoyo, A., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Munoz, M. J. and Arias, M. L. (2015): African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management*. 1:21.
141. Zaberezhnyi, A. D., Aliper, T. I., Grebennikova, T. A., Verkhovskii, O. A., Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Nepoklonov, E. A., L'vov, D. K. (2012): African swine fever in Russian Federation. *Voprosy Virusologii*. 57 (5): 4-10.
142. Anonymus (2014): Scientific Opinion on African swine fever. *EFSA Journal*. 2 (4): 3628.
143. Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Mateu, E., Vidal, D. and Gortázar, C. (2008): Antibody response of wild boar (*Sus scrofa*) piglets vaccinated against Aujeszky's disease virus. *Veterinary Record*. 162 (15): 484-485.
144. Leuenberger, R., Boujon, P., Thür, B., Miserez, R., Garin-Bastuji, B., Rüfenacht, J. and Stärk, K. D. C. (2007): Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Veterinary Record*. 160: 362-368.

145. Geering, W. A., Roeder, P. L. and Obi, T. U. Manual on the preparation of national animal disease emergency preparedness plans. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 1999.
146. Hartley, M. (2009): Qualitative risk assessment of the role of the feral wild boar (*Sus Scrofa*) in the likelihood of incursion and the impactson effective disease control of selected exotic diseases in England. European Journal of Wildlife Research. 56 (3): 401-410.
147. World Organisation for Animal Health (OIE), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015. OIE Terrestrial Manual 2015. Chapter 2.1.2., World Organisation for Animal Health, Paris, France, 2015.
148. Lee, C. H. L., Yang, J. S., Moon, H. J., Luo, Y. Z., Park, S. J., Kim, H. K., Kim, E. M. and Park, B. K. Simultaneous detection of Pseudorabies Virus, Porcine Cytomegalo virus and Porcine Circovirus from pigs using Multiplex PCR assay. In 20<sup>th</sup> IPVS Congr. Durban. 164.
149. Song, D. S., Kang, B. K., Oh, J. S., Ha, G. W., Yang, J. S., Moon, H. J., Jang, J. S. and Park, B. K. (2006): Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 18 (3): 278-281.
150. Oleksiewicz, M. B., Botner, A., Madsen, K. G. and Storgaard, T. (1998): Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. Veterinary Microbiology. 64: 7-22.
151. Kim, J., Han, D. U., Choi, C. and Chae, C. (2003): Simultaneous Detection and Differentiation between Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus in Boar Semen by Miltiplex Seminested Polymerase Chain Reaction. Journal of Veterinary Medical Science. 65 (6): 741-744.
152. WHO. (2013): Real-time RT-PCR Protocol for the Detection of Avian Influenza A(H7N9) Virus. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza. [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/collaborating\\_centres/list/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/)

153. Zepeda-Sein, C. (1998): Méthodes d'évaluation des risques zoonitaires lors des échanges internationaux. In Séminaire sur la sécurité zoonitaire des échanges dans les Caraïbes, 9–11 December 1997, Port of Spain, Trinidad and Tobago. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, 2–17.
154. Milicevic, V., Petrovic, T., Lupulovic, D., Maksimovic Zoric, J., Veljovic, J., Radosavljevic, V. and Plavsic, B. Classical Swine Fever Monitoring in Wild Boar in Serbia. STOP – CSF, International Scientific Conference, Novi Sad, Serbia, 2012.
155. Lupulović, D., Petrović, T., Lazić, S., Prodanov-Radulović, J., Došen, R., Pušić, I. (2011): The seroprevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Serbia. *Arhiv veterinarske medicine*. 4 (1): 19-29.
156. Lazic, S., Plavsic, B., Polacek, V., Lupulovic, D., Milicevic, V., Veljovic, Lj., Lazic, G., Prodanov-Radulovic, J., Bugarski, D. and Petrovic, T.: Testing the presence of Aujeszky`s disease among wild boars in Republic of Serbia. In: Petrovic T. Editor. Book of abstracts of the XVII Epizootiology and Epidemiology Symposium, Subotica: Serbian Veterinary Society: Section for Zoonoses. 2015. 70-71.
157. Cvijanović, D., Subic, J. and Parausic, V. Poljoprivredna gazdinstva prema ekonomskoj veličini i tipu proizvodnje u Republici Srbiji. Republički zavod za statistiku. 2014. ISBN 978-86-6161-129-2
158. G.A. Wobeser. Investigation and Management of Disease in Wild Animals. Springer Science+Business Media New York. 1994. ISBN 0-306-44703-7
159. Valcic, A. M. Opšta epizootologija. Beograd: Valcic, M. A, 1998. (Beograd: Banjac Print) ISBN 68465420
160. Milanko, Š., Ašanin, R., Krnjaić D., Palić T., Milić N., Jovanović Tanja, Kovačević Dragana, Plavšić B., Stojanović Dragica, Vidanović D. and Ašanin N. (2009): Examination of presence of specific antibodies against avian influenza virus in some species of wild birds. *Acta Veterinaria*. 59 (4): 381-403.
161. Savic, B., Radanovic, O., Jovicic, D., Nestic, K., Ivanovic, S., Stevancevic, O., Cvetojevic, Dj. and Kasagic D. (2015): Survey Of Infectious Agents Associated With Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) In Serbian Swine

- Herds Using Polymerase Chain Reaction (PCR) detection. *Acta Veterinaria*. 65 (1): 79-88.
162. Segales, J., Allan, G. M. and Domingo, M. (2005): Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*. 6: 119–142.
163. Goedbloed, D. J., van Hooft, P., Megens, H. - J., Bosch, T., Lutz, W., van Wieren, S. E., Ydenberg, R. C. and Prins, H. H. T. (2014): Host genetic heterozygosity and age are important determinants of porcine circovirus type 2 disease prevalence in European wild boar. *European Journal of Wildlife Research*. 60: 803–810.
164. Ivetic, V., Savic, B. and Valter D. (2004): Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in piglets – A Form of Circoviral Infection. *Veterinarski glasnik*. 58 (3-4): 419 – 431.
165. Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Hofle, U., Vicente, J. and Gortazar C. (2007): Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Veterinary Microbiology*. 120: 241-50.
166. Ruiz-Fons, F. Aujeszky's Disease, or Pseudorabies. In: Gavier-Widen, D., Meredith, A., Daff, J. P. Editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Wiley-Blackwell, 2012. 1-36.
167. Wittmann, G., Rziha, H. J. and Doller, P. C. (1982): Occurrence of Clinical Aujeszky's Disease in Immunosuppressed Latently infected pigs. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. 7: 211-219.
168. Muller, T. F., Teuffert, J., Zellmer, R. and Conraths, F. J. (2001): Experimental infection of European wild boars and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence. *American Journal of Veterinary Research*. 62: 252-258.
169. Spickler, A. R. *Emerging and Exotic Diseases of Animals*, 4<sup>th</sup> edn. Ames: CFSPH Iowa State University, USA. 2010. 329.
170. Wittmann, G., Jakubik, J. and Ahl, R. (1980): Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. *Archives of Virology*. 66: 227-240.

171. De Leeuw, P. W. and Tiessink, J. W. A. Evaluation of Aujeszky's Disease Virus Vaccine. In: Nielsen, N. C., Høgh, P., Bille, N. Editors. Proceedings of International Pig Veterinary Society, Copenhagen, Denmark, 1980. 112.
172. Terpstra, C. and Pol, J. M. A. Influence of vaccination with modified live vaccine on the laboratory diagnosis of Aujeszky's disease. In: Witman, G. and Hall, S. A. Editors. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Tübingen, Germany. 1981. 57-65.
173. Wittmann, G. (1985): Aujeszky's disease: factors important for epizootiology and control. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris). 4: 5-20.
174. Tham, K. M., Motha, M. X., Horner, G. W. and Ralston, J. C. (1994): Polymerase chain reaction amplification of latent Aujeszky's disease virus in dexamethasone treated pigs. Archives of Virology. 136: 197-205.
175. Yoon, H. A., Eo, S. K., Aleyas, A. G., Cha, S. Y., Lee, J. H., Chae, J. S., Jang, H. K., Cho, E. G. and Song, H. J. (2006): Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. Journal of Veterinary Medical Science. 68: 143-148.
176. Bitsch, V. (1980): Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's disease virus and their ability to cause cell fusion - syncytia formation - in cell cultures. Acta Veterinaria Scandinavica. 21: 708-710.
177. Nauwynck, H. J., Zonnekeyn, V. and Pensaert, M. B. (1997): Virological protection of sows upon challenge with Aujeszky's disease virus after multiple vaccinations with attenuated or inactivated vaccines. Journal » Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B. 44: 609-615.
178. Gielkens, J. A., Van Oirschot, J. T. and Berns, A. J. M. (1985): Genome Differences among Field Isolates and Vaccine Strains of Pseudorabies Virus. Journal of General Virology. 66: 69-82.

179. Keros, T., Brnic, D., Prpic, J., Dezdek, D., Jemersic, L., Roic, B. and Bedekovic, T. (2014): Characterisation of pseudorabies virus in domestic pigs and wild boars in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*. 62: 512-519.
180. Keros, T., Jemersic, L., Brnic, D., Prpic, J. and Dezdek, D. (2015): Pseudorabies in hunting dogs in Croatia with phylogenetic analysis of detected strains. *Veterinary Record Case Reports*. 3:1 e000181, doi:10.1136/vetreccr-2015-000181
181. Verin, R., Varuzza, P., Mazzei, M. and Poli, A. (2014): Serologic, molecular, and pathologic survey of pseudorabies virus infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 50: 559–565.



## **SPISAK SKRAĆENICA:**

BLAST - Basic Local Alignment Searching Tool

CPE - Citopatogeni efekat

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

ELISA - Enzimaska imunološka metoda (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

EVA - Virusni arteritis konja (Equine viral arteritis)

FTS - Fetalni teleći serum

GPS - Globalni sistem za pozicioniranje (global positioning system)

HA - Hemaglutinacija

LDV - Virus laktat dehidrogenaze miševa

MA - Morbus Aujeszky

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

MEM - Minimalna osnovna podloga za kulturu tkiva (Minimum essential medium)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OD - Optička gustina (Optical Density)

ORF - Otvoreni okvir čitanja (open reading frame)

PBS - Fosfatni pufer

PCR - Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction)

PCV2 - Porcine Circovirus 2

PDNS - Sindrom dermatitisa i nefropatije svinja (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome)

PK15 - Ćelijska linija poreklom od bubrega praseta (Porcine Kidney)

PMWS - Multisistemski sindrom kržljanja prasadi (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome)

PPV - Porcine Parvovirus

PRCV - Respiratorni Coronavirus svinja

PRDC - Kompleks respiratornih oboljenja svinja (Porcine Respiratory Disease Complex)

PRRSV - Virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus)

PRV - Pseudorabies virus

RK13.6 - Ćelijska linija poreklom od bubrega kunića (Rabbit kidney)

RNK - Ribonukleinska kiselina

RT-qPCR - Reverzna transkripcija- lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR - Reverzna transkripcija- lančana reakcija polimeraze (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

SHFV - Virus hemoragične groznice majmuna

SHV1 - Suid Herpesvirus 1

TBE - Tris/Borat/EDTA pufer

TCID - Infektivna jedinica virusa za kulturu tkiva (Tissue Culture Infectious Dose)

TGE - Transmisivni gastroenteritis

VNT - Virus neutralizacioni test

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана **Весна М. Милићевић**

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Испитивање раширености вирусних болести ензоотског потенцијала код дивљих свиња (*Sus Scrofa*) и анализа ризика у региону централне Србије“**

- 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, 19.4.2016.



\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Весна М. Милићевић**

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада: „Испитивање раширености вирусних болести ензоотског потенцијала код дивљих свиња (*Sus Scrofa*) и анализа ризика у региону централне Србије“

Ментор: Др сц Соња Радојичић, редовни професор

Потписана **Весна М. Милићевић**

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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, 19.4.2016.



\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**„Испитивање раширености вирусних болести ензоотског потенцијала код дивљих свиња (*Sus Scrofa*) и анализа ризика у региону централне Србије“**

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).

У Београду, 19.4.2016.

Потпис докторанда



## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Vesna M. Milićević je rođena u Ivanjici 29.12.1980. godine. Na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu - smer Veterinarska medicina, diplomirala je 2005. godine kao najbolji student generacije sa prosečnom ocenom 9,55.

Akademsko zvanje magistra veterinarskih nauka je stekla 29.12.2011. godine na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik je reizabrana 16.4.2015.

Zaposlena je u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu od 2005. godine, a od 2008. na mestu šefa odeljenja za virusologiju. U periodu oktobar 2012- jun 2013 radila je kao saradnik za laboratorijsku dijagnostiku slinavke i šapa u Sekretarijatu za slinavku i šap (EuFMD) pri FAO u Rimu.

Glavne oblasti istraživanja su epizootiologija i dijagnostika virusnih bolesti životinja klasičnim i molekularniom tehnikama.

Učestvovala je u većem broju međunarodnih i domaćih projekata i objavila više radova.