



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

**НАЛАЗ КАРАКТЕРИСТИЧНИХ
ПАТОМОРФОЛОШКИХ ПРОМЕНА КОД
ОВАЦА ИНФИЦИРАНИХ ВИРУСОМ
КАТАРАЛНЕ ГРОЗНИЦЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

др Ивана Давидов, доцент
др Миодраг Радиновић, доцент

Кандидат:

мр Никола Пејовић

Нови Сад, 2016. године

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	мр Никола Пејовић
Ментори: МН	др Иван Давидов, доцент др Миодраг Радиновић, доцент
Наслов рада: НР	Налаз карактеристичних патоморфолошких промена код оваца инфицираних вирусом катаралне грознице
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски / енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Аутономна Покрајина Војводина
Година: ГО	2016.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.
Физички опис рада: ФО	8 поглавља / 158 странице / 52 слика / 20 табела / 4 графикона / 350 референци / 5 прилога
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НД	Патологија
Предметна одредница, кључне речи: ПО	катарална грозница оваца, патоморфолошки налаз, патохистолошки налаз, ВТВ-4, вектори
УДК	636.3:578.819(043.3)

<p>Чува се: ЧУ</p>	<p>У библиотеци Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду 21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.</p>
<p>Важна напомена: ВН</p>	<p>Нема</p>
<p>Извод: ИЗ</p>	<p>Вирус катаралне грознице оваца наноси велике штете сточарској производњи због чега су правовремено препознавање болести и брза дијагноза есенцијални предуслови за адекватну реакцију ветеринарске службе. Из тих разлога, предмет ове докторске дисертације су анализе патолошких и хистолошких промена код животиња, серолошких и молекуларних метода потребних за идентификацију и ближу карактеризацију узрочника што је од примарног значаја за ефективност предузетих мера у борби против катаралне грознице оваца.</p> <p>Серолошки, током активног надзора, пргледано је 944 узорка крвног серума оваца и 953 узорка крвног серума говеда, а потом, током пасивног надзора, 114 узорака крвног серума говеда, 302 узорка крвног серума оваца и 22 узорка крвног серума коза. Коришћена је компетитивна имуноензимска ELISA метода, којом је доказано присуство специфичних антитела код говеда, оваца и коза. Из пуне крви серопозитивних јединки, ланчаном реакцијом полимеразе уз коришћење Pan-BTV rRT-PCR протокола заснованог на публикацији Toussiant и сар., (2007) је доказано присуство секвенце вирусне РНК. У случају позитивних резултата спроведена је и конвенционална PCR метода, употребом One step PCR кита, уз коришћење два пара прајмера за серотип BTV-4 чиме је доказано да је овај серотип узрочник обољења у Црној Гори. Секвенцирањем и филогенетском анализом изолата утврђено је да припада западном топотипу BTV-4 и да је сродан, готово идентичан са изолатима земаља из окружења.</p> <p>Од 302 овце, којима је узета крв за серолошку анализу, уочене су карактеристичне макроскопске и микроскопске промене код свих угинулих од катаралне грознице оваца. Испитивањем је обухваћено 20 угинулих оваца које су претходно, током испитивања за живота, поред манифестне клиничке слике, имале позитивне резултате серолошких и молекуларних испитивања. Након угинућа, овце су обдуковане при чему су констатоване и сликане макроскопске промене те издвојена ткива за хистолошке анализе. Ткива су фиксирана у 10% пуферизованом неутралном формалину, а потом уклапљена у парафин. Парафински исечци дебљине 5 микрометара су бојени хематоксилин-еозин методом. На промењеним органима доминирају едем, хиперемија и крварења. Хистолошки се запажају интензивне хеморагичне инфилтрације свих промењених органа, а поред тога и местимични некротични процеси у срцу и језику као и периваскуларни едеми лимфних органа са израженом</p>

	лимфоцитном деплецијом у лимфним чворовима, слезини и тимусу.
Датум прихватања теме од стране НН већа: ДП	11.03.2016.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	<p>Председник: _____ др Бранислава Белић, <i>редовни професор</i> Пољопривредни факултет, Нови Сад</p> <p>Ментор: _____ др Ивана Давидов, <i>доцент</i> Пољопривредни факултет, Нови Сад</p> <p>Ментор: _____ др Миодраг Радиновић, <i>доцент</i> Пољопривредни факултет, Нови Сад</p> <p>Члан: _____ др Марко Цинковић, <i>доцент</i> Пољопривредни факултет, Нови Сад.;</p> <p>Члан: _____ др Дејан Бугарски, <i>научни сарадник</i> Институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Nikola Pejović
Mentor: MN	Ivana Davidov, Ph.D. Assistant Professor Miodrag Radinović, Ph.D. Assistant Professor
Title: TI	Finding characteristic pathomorphological changes in sheep infected with catarrhal fever
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Physical description: PD	8 chapters /158 pages / 20 tables / 52 figures / 4 charts / 350 literature quotation / 5 annexes
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Pathology
Subject, Key words SKW	ovine catarrhal fever, pathomorphological findings, histopathologic findings, BTV-4, vectors
UDC	636.3:578.819(043.3)

Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture, University of Novi Sad 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Republic of Serbia
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The Bluetongue virus (BTV) incurs great damage to the production of livestock, due to which timely recognition of the resultant disease and rapid diagnosis are essential prerequisites for an adequate reaction by the veterinary service. For these reasons, the subject of this doctoral dissertation are the analyses of pathological and histological alterations in animals, the serological and molecular methods necessary for identifying and closely characterizing the causative agent which is of primary concern for the efficacy of the measures taken in the fight against bluetongue disease.</p> <p>Serologically, during active surveillance, 944 samples of sheep blood serum as well as 953 samples of cattle blood serum were examined, followed by 114 samples of cattle, 302 samples of sheep and 22 samples of goat blood serum during passive surveillance. Competitive ELISA was utilized to detect the presence of specific antibodies in cattle, sheep and goats. The presence of viral RNA sequences was confirmed in whole blood samples of seropositive individuals using the Pan-BTV rRT-PCR protocol as described in Toussiant et al. (2007). In the case of positive results conventional PCR analysis was also performed, using the One Step PCR kit with two primer pairs specific to the BTV- serotype, which showed that this serotype is the cause of the disease in Montenegro. Sequencing and phylogenetic analysis of the isolate determined that it belongs to the western topotype of BTV-4 and that it is related and practically identical to the isolates from neighbouring countries.</p> <p>This work describes the macroscopic and microscopic changes found in sheep which died due to affliction with bluetongue disease. The study investigated a sample of 20 sheep for which premortem analysis, apart from the manifested clinical features, had confirmed positive serologic and molecular test results. The animals were dissected postmortem during which macroscopic alterations were identified and imaged, followed by tissue isolation for histological analysis. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 5µm thickness were cut and stained with haematoxylin/eosin. The predominant organ changes identified included edema, hyperaemia and bleeding. Histologically intensive hemorrhagic infiltrations of all affected organs were observed as well as sporadic necrotic processes in the heart and tongue accompanied by perivascular edemas of the lymphoid organs with pronounced lymphocyte depletion within the lymph nodes,</p>

	spleen and thymus.
--	--------------------

Accepted on Scientific Board on: AS	11 th March 2016
Defended: DE	
Thesis Defence Board: DB	<p>President: _____ Branislava Belić, Ph.D. Full Professor Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Mentor: _____ Ivana Davidov, Ph.D. Assistant Professor Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Mentor: _____ Miodrag Radinović, Ph.D. Associate Professor Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Member: _____ Marko Cincović, Ph.D. Assistant Professor Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Member: _____ Dejan Bugarski, Ph.D. Research Associate Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, Novi Sad</p>

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	4
2.1. Историјат катаралне грознице оваца	4
2.2. Карактеристике вируса катаралне грознице оваца	10
2.3. Патогенеза катаралне грознице оваца	14
2.4. Репликација вируса катаралне грознице оваца	16
2.5. Виремија и имунолошки одговор	23
2.6. Патолошке промене код катаралне грознице оваца	28
2.7. Клинички симптоми код катаралне грознице оваца	29
2.8. Дијагностика катаралне грознице оваца	31
2.9. Ширење катаралне грознице оваца	35
2.10. Презимљавање вируса катаралне грознице оваца	42
2.11. Животињске врсте пријемчиве на инфекцију вирусом катаралне грознице оваца	44
2.12. Фактори везани за домаћина који утичу на појаву катаралне грознице оваца	44
2.13. Детерминанте вируленције вируса катаралне грознице оваца	47
2.14. Еволуција вируса катаралне грознице оваца	54
2.15. Превенција и терапија катаралне грознице оваца	55
2.16. Контрола вектора	58
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	59
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	60
4.1. Патоморфолошке и патохистолошке методе	61
4.2. Серолошка и молекуларна испитивања	65
4.2.1. Екстракција РНК	68
4.2.2. Real-time RT-PCR	70
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	76
5.1. Серолошки и молекуларни налаз прве групе	76
5.2. Серолошки и молекуларни налаз друге групе	80
5.3. Макроскопски налаз	84
5.4. Микроскопски налаз	99
5.4.1. Патохистолошки налаз на плућима	99
5.4.2. Патохистолошки налаз на срцу	102
5.4.3. Патохистолошки налаз на језику	104
5.4.4. Патохистолошки налаз на једњаку	104
5.4.5. Патохистолошки налаз на јетри	105
5.4.6. Патохистолошки налаз на бубрезима	107
5.4.7. Патохистолошки налаз на слезини	107
5.4.8. Патохистолошки налаз на тимусу	110
5.4.9. Патохистолошки налаз на лимфним чворовима	112
6. ДИСКУСИЈА	114
7. ЗАКЉУЧЦИ	127
8. СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ	129
9. ПРИЛОЗИ	153
10. БИОГРАФИЈА (<i>CIRRCULUM VITAE</i>) АУТОРА	160

1.УВОД

Катарална грозница оваца или плави језик је неконтагиозна, инфективна артроподама преносива болест преживара и камелида коју узрокује вирус (BTV) из рода *Orbivirus* и фамилије *Reoviridae*. Вирус катаралне грознице оваца садржи десет линеарних дволанчаних РНК сегмената (dsRNA), који енкодирају седам структурних (VP1-VP7) и пет неструктурних протеина (NS1, NS2, NS3, NS3/A, NS4). Протеинске варијације спољашњег капсида посебно VP2 одређују серотипску специфичност. До данас је серум-неутрализационим тестом идентификовано 27 серотипова. Осим серотипског диверзитета, циркулација вируса кроз разне екосистеме широм целог света је довела до настанка различитих географских варијанти вируса или топотипова. Вируси се деле на западну и источну лозу, а даље на регионалне топотипове. Ова подела је заснована на филогенетској анализи нуклеотидних секвенци сегмената вирусног генома. Вируси који припадају западној лози циркулишу у Африци, Карибима и Америци док они који припадају источној лози циркулишу у Азији, Индонезији и Аустралији. Способност вируса да реасортира и рекомбинује сегменте свог генома у ћелијама домаћина или вектора које су истовремено инфициране са више од једног соја или серотипа чини класификацију вируса још компликованијом. На тај начин у природи могу настати нови сојеви вируса чији сегменти или делови сегмената генома имају различито порекло. Због тога је пожељно вирусну топотипизацију спроводити кроз анализе података секвенци више од једног појединачног геномског сегмента.

Катарална грозница оваца се преноси преко зрелих женки хематофагних инсеката који припадају роду *Culicoides*. Преко 1400 врста, вектора ове болести, је описано, али нешто око тридесет врста има улогу преносиоца. Због тога је географска дистрибуција катаралне грознице оваца везана за дистрибуцију компетентних векторских врста и климатске услове који су неопходни за њихов опстанак. Из тих разлога је катарална грозница оваца ендемска болест у тропским и

субтропским областима између 40° северне и 35° јужне географске ширине мада се у одређеним регионима Северне Америке и Кине болест проширила на области до 50° северне географске ширине. Од 1998. године дошло је до драматичних промена у дистрибуцији катаралне грознице оваца која се проширила на земље западне и северне Европе, све до Скандинавије. Постоји уверење да се експанзија болести на север Европе, за који се сматрало да је изван најсеверније географске ширине која подржава опстанак куликоида, барем делимично може приписати ефекту глобалних климатских промена. Поред тога, неке широко распрострањене Палеарктичке врсте куликоида, првенствено *Obsoletus* и *Pulicaris complex*, су укључене у преношење болести на северу Европе.

Вирус катаралне грознице оваца је инфективан за преживаре и камелиде, али се озбиљно, клинички манифестно обољење јавља најчешће код оваца и неких врста дивљих преживара као што је северноамерички белорепи јелен. Говеда и козе након инфекције обично не испољавају симптоме болести мада се акутне инфекције са клиничком манифестацијом могу појавити и код њих у областима где катарална грозница оваца до тада није била заступљена. Током епидемије катаралне грознице оваца узроковане серотипом 8 вируса (BTV-8), која је избила у Европи, клиничка слика се сасвим јасно испољила и код говеда и код коза. Говеда су имала исцедак из ока, коњунктивитис, хиперемију слузнице усне дупље са улцерацијама и некротичним лезијама на уснама и језику као и едеме. Код инфицираних коза је дошло до наглог пада продукције млека са појавом едема на глави и уснама. Поред тога, козе су имале исцедак из носа и изражен еритем коже и вимена. У ендемичним областима говеда и козе се сматрају врло значајним домаћинима због пролонгиране виремије без испољавања клиничких симптома. У задњем кварталу 2014. године катарална грозница оваца узрокована серотипом 4 (BTV-4) је избила у Црној Гори. Током ове епидемије клиничку слику су манифестовале не само овце него и говеда. Оболела говеда су имала високу телесну температуру, исцедак из ока, коњунктивитис и исцедак из носа. Болест се може пренети преко инфективне сперме током периода виремије као и ингестијом инфективних плаценталних овојница или феталног материјала. Инфекција gravidних јединки са одређеним сојевима вируса, посебно атенуираним

вакциналним сојевима вируса, може довести до трансплацентарне инфекције. У зависности од периода гестације у коме се инфицира фетус, женке могу побацили или на свет донети мртворођену односно невиталну младунчад са озбиљним деформитетима на централном нервном систему. Управо се епидемија катаралне грознице оваца у Европи изазвана серотипом 8 вируса (BTV-8) карактерисала способношћу узрочника да пасира плаценталну баријеру и узрокује инфекцију фетуса у високом степену, што је својство које се прије тога генерално није доводило у везу са дивљим сојевима вируса.

Вирус катаралне грознице оваца првенствено инфицира ендотелне ћелије у зиду крвних судова, моноклеарне фагоците и дендритичне ћелије. Оштећења ендотелних ћелија узрокована вирусом резултирају настанком васкуларних тромбоза, ткивних инфаркта, некроза и крварења. Ове лезије доводе до настанка клиничких симптома код оваца који се манифестују као грозница са високом температуром која је праћена појавом серозног до хеморагичног исцетка из носа, озбиљним плућним едемом и едемом главе, појавом ерозија и улцерација на језику, уснама и уопште слuzници усне дупље, појавом шепавости са хиперемијом коронарног руба и тортиколисом. Овце могу да буду субклинички инфициране или клиничка слика може варирати од врло благе до оне са озбиљним клиничким симптомима која се често заврши смрћу. Морталитет међу пријемчивим овцама може бити од 2-30% повремено чак и до 70%. Преживеле јединке имају дуг период опоравка и смањене продуктивне и репродуктивне особине.

Економски губици проузроковани катаралном грозницом оваца су знатни и резултат су не само високог морбидитета и морталитета него и трговинских ограничења која се односе на преживаре из погођених регија. Такође, велики трошкови су везани за мере надзора над болешћу, вакцинацију, контролу вектора као и третман клинички оболелих јединки.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјат катаралне грознице оваца

Катарална грозница оваца или плави језик је инфективна неконтагиозна, артроподама преносива болест преживара и камелида узрокована вирусом (BTV) из фамилије Reoviridae, род Orbivirus (Mertens и сар., 2005). Први забележени случај катаралне грознице оваца датира још с краја 18. века када су овце осетљиве мерино расе из Европе увезене у Јужну Африку (Spreull, 1905). Болест је у почетку добила име грозница или епизоотски катар, а касније је названа маларијска катарална грозница оваца јер се веровало да је узрочник неки унутрашњи паразит (Hutcheon, 1881,1902). Први дијагностиковани случај болести код говеда је био 1933. године (Bekker и сар., 1934) и због сличне клиничке слике са оном која се јавља код слинавке и шапа болест је била позната под називом “лажна слинавка и шап” (Vellema, 2008). Болест је добила назив “bluetongue” од локалног “bloutong” како су је називали јужноафрички фармери који су запазили оток и цијанозу језика код тешко оболелих јединки (MacLachlan и сар., 2009).

Катарална грозница оваца узрокована филтрабилним агенсом који је нађен у крви оболелих животиња, али који није нужно везан за црвене крвне ћелије. Болест није показивала знаке контагиозности, али су крв, екстракт слезине или серуми од виремичних животиња показали инфективност када се инокулирају здравим животињама (Spreull, 1905). На основу сазнања да инфициране јединке стварају снажан имунитет који их штити од накнадних инфекција са инфективним материјалом Theiler је 1908. године мултиплим пасажама виремичне овчије крви (BTV-4) покушао да произведе вакцину против болести плавог језика (Theiller, 1908). Ова прва вакцина је са мање или више успеха коришћена преко четрдесет година и индуковала је одређени степен заштите против неколико серотипова вируса катаралне грознице (Coetzee и сар., 2012a).

Године 1948. Neitz је спровео опсежно имунолошко испитивање код оваца које је по први пут показало присуство разних типова вируса катаралне грознице.

Експерименти спроведени у циљу доказивања унакрсне заштите између појединих сојева показали су да инфекција изазвана једним сојем вируса индукује заштиту против истог соја, али не и ефективну заштиту против хетерологих сојева (Howell, 1960; Howell и сар., 1970). Касније, Howell и сарадници су дефинисали првих 16 серотипова ВТВ користећи серум неутрализациони тест. Број познатих серотипова је данас проширен на 27 од којих је последњи дефинисан 2015. године (Jenckel и сар., 2015).

Два нова серотипа вируса (ВТВ-25 и ВТВ-26) су изолована од животиња без клиничких симптома или са симптомима који нису карактеристични за болест плавог језика. Нити један од ова два серотипа (ВТВ-25 и ВТВ-26) није детектован помоћу најчешће коришћеног RT-PCR (сегмент 1) теста (Shaw и сар., 2007). Нови сој ВТВ је откривен код клинички здравих коза у Швајцарској 2008. године. Секвенцирање је показало да се овај сој разликује од остала 24 серотипа и именован је као серотип 25 (Hofmann и сар., 2008). Почетком 2010. године у Кувајту у једном стаду оваца и коза постављена је сумња на болест плавог језика. Детектована је ВТВ РНК у лабораторији у Пирбрајту помоћу RT-PCR (сегмент 10) (Ogги и сар., 2006). Извршено је секвенцирање сегмената генома 2, 3 и 7 који кодирају синтезу VP2, VP3 и VP7, затим њихово поређење са осталим орбивирусима укључујући и све изолате ВТВ. Резултати су показали да се ради о новом, 26. серотипу који показује велику сличност са ВТВ-25. Међутим, мишљење је да ВТВ-26 сој није био примарни узрок клиничких симптома болести у стаду оваца и коза (Maan и сар., 2011). Експериментална инфекција оваца са ВТВ-26 била је праћена са веома благом клиничком сликом и пролазном виремијом (Batten и сар., 2012).

Још један серотип ВТВ-27 је откривен 2014. године у Француској (Корзика). Серотип ВТВ-27 је показао блиску сродност са ВТВ-25 из Швајцарске и ВТВ-26 из Кувајта (Jenckel и сар., 2015).

Дуго се сматрало да је катарална грозница оваца искључиво везана за Афрички континент. Међутим, 1943. године болест је избила на Кипру, погодила 60 – 70 % тамошње популације оваца и узроковала смрт више од 2500 оваца на острву (Sellers, 1975). Неки ранији извештаји су указивали да је двадесетих година

двадесетог века било појаве обољења на Кипру са значајним губицима током 1924. и 1939. године. У то време, болест је била позната као “стоматитис” и тек је 1943. године доказано да је болест узрокована вирусом (BTV) (Erasmus, 1985; Sellers, 1975). Традиционално, вирус је био присутан у географским областима које леже између 40° северне и 35° јужне географске ширине где су вектори, боље рећи одређене врсте хематофагних мушица, живеле (Rodrigues-Sanchez и сар., 2008; Vellema, 2008; Wilson и сар., Mellor, 2009). У северној Америци и Кини вирус се проширио чак даље на север до 50° северне географске ширине (Mellor и сар., 2000).

Катарална грозница оваца је такође откривена и у Израелу 1943-1944. (Shimshony, 2004), 1948. је откривена у Тексасу (Hardy и Price, 1952), између 1956. и 1957. године велика епидемија је избила на Иберијском полуострву која је убила око 180000 оваца, а затим је обољење регистровано на Средњем Истоку, Азији и земљама југоисточне Европе (Gibbs и Greiner, 1994; Mellor и Wittmann, 2002; MacLachlan, 2004). У Аустралији се болест први пут појавила 1977. године (Gibbs и Greiner, 1994), а у Јужној Америци је откривена осамдесетих година двадесетог века (Rosadio и сар., 1984; Lopez и сар., 1985; Tamayo и сар., 1985; Clavijo и сар., 2002). Катарална грозница оваца је такође присутна у централној Америци, Мексику, Новој Гвинеји, Тајланду, Кини, Јапану, Индијском субконтиненту, Медитерану, Португалији, Бугарској и осталим земљама (Baylis и Mellor, 2001; Mellor и Wittmann, 2002; Tweedle и Mellor, 2002; Mehlhorn и сар., 2007; Mellor и сар., 2008). Последњих година болест се проширила далеко на север и тако стигла до Велике Британије и Канаде (Purse и сар., 2005). Данас је само Антарктик слободан од BTV инфекције (MacLachlan и сар., 2009).

Епидемија болести која је избила на Иберијском полуострву (BTV-10) средином педесетих година двадесетог века била је праћена високом стопом морталитета и тиме запретила земљама Европе слободним од болести (Manso-Ribeiro и сар., 1957). ОИЕ је класификовала болест плавог језика као болест са листе А већ средином шездесетих година прошлог века. Овом одлуком се сасвим оправдано изриче увођење строгих увозно-извозних прописа који се односе на животиње из погођених области. Међутим, увођење ових регулаторних мера је

имало много теже економске последице по земље погођене болешћу него сама болест (Gibbs и Greiner, 1994). Ширењем болести на претходно слободне регије северне Европе укључујући и Скандинавско полуострво те појавом неколико додатних серотипова у југоисточној регији Сједињених држава и северној Аустралији, катарална грозница оваца је завредила пажњу као једна од најзначајнијих болести животиња у двадесет првом веку (Purse и сар., 2005; MacLachlan и Guthrie, 2010).

Током двадесетог века катарална грозница оваца је повремено забележена у земљама југоисточне Европе (Шпанија, Португалија, Грчка и Кипар), (Mellor и Boorman, 1995; Hendrickx, 2009). Међутим, од 1998. године вирус– узрочник катаралне грознице оваца је присутан у југоисточној Европи и медитеранским земљама, одакле се постепено ширио на области до тада слободне од овог вируса. Сматра се да је присуство вируса северно од Алпа повезано са глобалним климатским променама које су омогућиле ширење главног вектора ове болести – *Culicoides imicola* (Purse и сар., 2005; Randolph и Rogers, 2010). У Грчкој је болест регистрована 1998. године, у Бугарској и Турској следеће године а потом такође и у Србији, Црној Гори и Македонији. Већ 2000. године болест је регистрована на Сардинији, Корзици, Менорки, Малорки и Италији. Следеће године болест је први пут регистрована у Хрватској, а наредних година у Босни и Албанији. Од 1998. године неколико серотипова вируса (BTV-1,-2,-4,-9,-16) је регистровано у југоисточној Европи (Mellor и Witmann, 2002; Анонимно, 2007; Mellor и сар., 2008; Saegerman и сар., 2008). У августу 2006. епидемија катаралне грознице оваца је одједном и неочекивано избила у Северној Европи, прво у Холандији, а брзо потом и у Белгији, Немачкој и северној Француској (Thiry и сар., 2006; Carpenter и сар., 2009; Wilson и Mellor 2009). Узрочник је био серотип 8 вируса катаралне грознице оваца (Elbers и сар., 2008a; Mintiens и сар., 2008) који је уобичајен у Кенији (Davies, 1978), Нигерији (Sellers, 1984), Судану (Mohammed и Taylor, 1987), Малавију (Haresnape и сар., 1988), Јужноафричкој Републици (Nevill и сар., 1992), Индији (Prasad и сар., 1992b), централној Америци и Карибима (Gibbs и Greiner, 1994; Мо и сар., 1994). Од 2006. године до данас серотип 8 није био регистрован у Европи (Mintiens и сар., 2008; Wilson и Mellor, 2009). Постоји неколико теорија које

покушавају да дају објашњење појаве овог серотипа у Европи као нпр. увоз виремичних животиња, инфицираног семена или ембриона, нехотични увоз инфицираних вектора увозом животиња или биљака мада се не искључује ни могућност уласка вектора ваздушним путем на својим крилима помогнутим ветром (Saegerman и сар., 2008). Постојале су претпоставке и да је епидемија узрокована серотипом 8 (BTV-8) на неки начин у вези са употребом Јужно – афричке “Група Б” мултивалентне живе вакцине (Маан и сар., 2008). Секвенцирањем генома BTV-8NET2006/4 се показало да сој није пореклом од вакцине. Филогенетска анализа сегмента 2 (S2) је показала блиску сродност са Нигеријским сојем BTV-8 указујући да би BTV-8NET2006/4 могао потицати из субсахарске Африке (Маан и сар., 2008) Ипак, на крају, којом рутом је BTV-8 ушао у Европу остаје неразјашњено.

До краја 2006, BTV-8 је регистрован у Луксембургу (Carpenter и сар., 2009; Wilson и Mellor 2009). Сој који је узроковао велики број епидемија широм континента је био необичан и интересантан из више разлога. Не само што је први серотип који је погодио области северне географске ширине изнад 52° већ је показао значајну вирулентност код својих домаћина оваца (Wogwa и сар., 2009). Након ове изненадне епидемије постојале су велике наде да вирус неће преживети хладни зимски период. Нажалост, испоставило се да вирус не само да је преживео зимски период у северној Европи већ је наредне 2007. године погодио још већи број јединки у већ погођеним земљама, а појавио се у Великој Британији (Wilson и Mellor, 2009). Такође, те исте године болест је регистрована у Швајцарској, Данској и Чешкој Републици (Saegerman и сар., 2008; Schwartz-Cornil и сар., 2008; Hendrickx, 2009). Нове епидемије катаралне грознице оваца регистроване су у Мађарској, Аустрији и Шведској 2008. године (Carpenter и сар., 2009; Agren и сар., 2010; Kampen и Werner, 2010; Lewerin и сар., 2010). Почетком 2009. године болест је регистрована и у Норвешкој (Анонимно, 2009b).

Интересантно је и то што је овај сој BTV-8 узроковао и симптоматску инфекцију код говеда у неким случајевима, а уследило је откриће да може пасирати плаценталну баријеру и тако вертикално прећи са мајке на плод (Backx и сар., 2009; Dal Pozzo и сар., 2009; Santman-Berends и сар., 2010a; Santman-Berends и сар., 2010b; van Schaik и сар., 2008). Овај серотип је изазвао обољење са јако израженим

респираторним симптомима, едемима, коронитисом и некрозом језика код оваца па и говеда да би касније фреквентније биле промене типа лезија назалне мукозе и коњунктивитиса (Elbers и сар., 2008b)

Морбидитет оваца након избијања епидемије 2006. године у Холандији је био низак, али је леталитет достигао вредност од 50%. Леталитет код говеда је био 13 пута нижи, али је до 80% инфицираних говеда показало јасне симптоме болести. (Elbers и сар., 2008c)

ВТV серотип 6 је идентификован у Холандији и Немачкој 2008 године, а серотип 11 у Белгији исте те године. Оба серотипа воде порекло од вакциналних сојева (De Clercq и сар., 2009; Eschbaumer и сар., 2010) који су највероватније последица илегалне употребе нелиценцираних атенуираних вакцина (MacLachlan, 2010), од стране очајних фармера који су се суочавали са штетним последицама епидемија са жељом да заштите своје фарме.

Крајем маја 2014. године случај катаралне грознице оваца је клинички дијагностикован у Грчкој-јужни Пелопонез, преко 400 км даље од најближег дијагностикованог случаја болести. Клиничка дијагноза је потврђена у лабораторији употребом компетитивног ELISA теста и rt-RT-PCR. До краја јуна болест се проширила на цели Пелопонез, а до краја августа на целу земљу (OIE, 2014). Друга земља у региону која је објавила присуство болести у јулу месецу 2014. била је Бугарска (OIE, 2014), да би потом о присуству болести на својим територијама у периоду од августа до децембра 2014. године известиле Албанија, Хрватска, Македонија, Мађарска, Црна Гора, Румунија, Србија и Турска (Niedbalski, 2015). У свим овим земљама кумулативни резултати показују да је било више од 7000 случајева избијања болести са апроксимативно 110.000 клиничких случајева код разних животињских врста. Забележено је готово 40.000 угинућа (OIE, 2014; 2015).

Иницијалне индиције су указивале да су сојеви вируса изоловани у Бугарској и Грчкој, иако припадници западног топотипа, били различити (Roberts и сар., 2014). Касније је секвенцирањем и филогенетском компарацијом констатовано да сојеви изоловани из узорака сакупљених у Грчкој и Бугарској деле 99,9% нуклеотидне сличности. (Mertens и сар., 2014).

Као и у југоисточној Европи, нови BTV серотипови су идентификовани у Сједињеним Америчким Државама, Аустралији и Израелу у последњој декади. У Сједињеним државама поред серотипова BTV-2,-10,-11,-13,-17 нађених током избијања болести пре 1999, серотипови BTV-1,-3,-5,-6,-9,-12,-14,-19,-22,-24 су изоловани у наредним годинама. У Аустралији су 2007. и 2008. године новоидентификовани серотипови били BTV-2 и BTV-7. Слична је ситуација била у Израелу где су поред раније регистрованих серотипова BTV-2,-4,-6,-10,-16 новоидентификовани серотипови били BTV-8,-15,-24 (MacLachlan, 2010).



Слика1. Глобална дистрибуција вируса плавог језика преузета са: http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins/btv-serotype-distribution.htm

2.2. Карактеристике вируса катаралне грознице оваца

Вирус катаралне грознице оваца припада роду *Orbivirus* из фамилије *Reoviridae*. Овој фамилији припада 15 родова дволанчаних РНК вируса (Табела 1), који су инфективни за широк спектар домаћина почевши од биљака преко инсекта риба до сисара и човека. Вируси који припадају родовима *Coltivirus*, *Fijivirus*,

Orbivirus, *Oryzavirus* и *Phytoreovirus* се преносе преко инсеката као вектора, док се остали углавном шире фекално-оралном рутом (Mellor и сар., 2009).

Табела 1. Приказ родова из фамилије *Reoviridae*

Род	Број сегмената генома	Домаћин	Вектор
<i>Aquareovirus</i>	11	Мекушци, рибе ракови	-
<i>Cardoreovirus</i>	12	Ракови	-
<i>Coltivirus</i>	12	Сисари (и човек)	Крпељи
<i>Cypovirus</i>	10	Инсекти	-
<i>Dinovernavirus</i>	9	Комарци	-
<i>Fijivirus</i>	10	Биљке	Скочибуба
<i>Idnoreovirus</i>	10	Инсекти	-
<i>Mimoreovirus</i>	11	Фитопланктон	-
<i>Mycoreovirus</i>	11/12	Гљиве	-
<i>Orbivirus</i>	10	Сисари (и човек) птице	Мушице, комарци, крпељи
<i>Orthoreovirus</i>	10	Птице, рептили, сисари (и човек) рибе	-
<i>Oryzavirus</i>	10	Биљке	Скочибуба
<i>Phytoreovirus</i>	12	Биљке	Цврчак
<i>Rotavirus</i>	11	Птице, сисари (и човек)	-
<i>Seadornavirus</i>	12	Сисари (и човек)	Комарци

(Mellor, 2009; Yamanaka и сар., 2014)

По морфологији, вирус катаралне грознице оваца је сличан другим вирусима из рода *Orbivirus* који узрокују такође значајне болести као што су куга коња (AHSV), епизоотијска хеморагијска болест дивљих преживара (EHDV) и болести

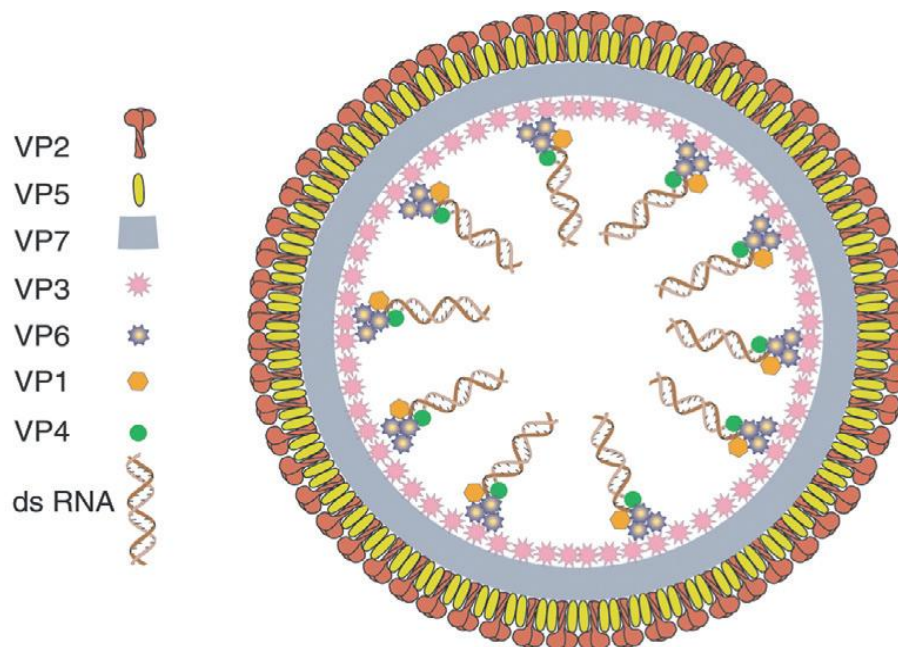
коња узроковане еквиним енцефалозис вирусом (EEV). Вируси су без омотача, 90 nm у пречнику са трослојним икозаедричним протеинским капсидом (Huismans и Erasmus, 1981; Prasad и сар., 1992a; Grimes и сар., 1998; Roy и Noad, 2006). Геном се састоји од десет дволанчаних РНК сегмената који кодирају синтезу седам структурних протеина (VP1-VP7) и четири неструктурна протеина (NS1-NS4) (Kar и сар., 2007; Roy, 2008). Спољашњи слој се састоји од два протеина VP2 и VP5 (Verwoerd и сар., 1972; Nason и сар., 2004; Roy и Noad, 2006). Серотип вируса је одређен протеином VP2 који је одговоран за везивање са рецепторима, хемаглутинацију и изазивање имунолошког одговора домаћина стимулацијом синтезе неутрализирајућих антитела (Huismans и Erasmus, 1981; Cowley и Gorman, 1987; Mertens и сар., 1989; Hassan и Roy, 1999; Roy, 1992, 2008). Протеин VP2 је најваријабилнији међу протеинима вируса, па се варијације аминокиселинских секвенци између серотипова јављају чак до 73% па вероватно због тога и нема значајне унакрсне имунолошке заштите између различитих серотипова вируса (Maan и сар., 2007). Постоје само два релативно конзервирана региона (амино киселине 338-379 и 946-961) чија специфична улога у инфекцији овим вирусом није још разјашњена (Maan и сар., 2007a). Знатно мању улогу у имунолошком одговору домаћина и то у хуморалном имунолошком одговору има протеин VP5 (Hassan и сар., 2001; Roy, 2008). VP5 је мањи протеин спољашњег слоја који гради глобуларне тримерне комплексе везане за VP2 протеин (Zhang и сар., 2010). Утврђено је да се састоји од два домена раздвојена једним флексибилним регионом. N терминални домен садржи структуру у виду спиралног калема док C терминални крај има глобуларну грађу (Hassan и сар., 2001; Zhang и сар., 2010). N терминални регион игра улогу у у дестабилизацији мембране домаћина и носилац је цитооткисног ефекта (Hassan и сар., 2001; Forzan и сар., 2004)

Средњи слој је грађен од протеина VP7 који је главна детерминанта серогрупне специфичности (Inumagi и сар., 1987; Oldfield и сар., 1990, Anthony и сар., 2007) и носилац је епитопа у ELISA тестовима за детекцију антитела. Унутрашњи слој се већим делом састоји од протеина VP3 (Grimes и сар., 1998) и три мања структурна протеина VP1, VP4 и VP6 који су укључени у процесе транскрипције и репликације вирусне рибонуклеинске киселине (Prasad и сар.,

1992a; Nason и сар., 2004; Schwartz-Cornil и сар., 2008). Заправо, језгро вируса је смештено у двослојном протеинском омотачу при чему је унутрашњи слој сачињен од VP3, а за њега се периферно споља качи VP7 те заједно формирају стабилно језгро вирусне честице (CLP – core like particles) (Grimes и сар., 1998; Такака и сар., 1995). Мономери VP3 показују тенденцију удруживања чиме формирају декамере који се састоје од два сета сачињена од по пет протеина са различитом конформацијом (Grimes и сар., 1997; Grimes и сар., 1998). VP3 декамери су веома битни за формирање нових вирусних честица и везани су за VP1 и VP4 (Nason и сар., 2004; Кар и сар., 2004).

VP7 гради спољашњи слој протеинског омотача вирусне честице и постоје индикације да су површински протеини омотача вирусног језгра одговорни за улазак вируса у ћелије *Culicoides* врста (Mertens и сар., 1996; Тан и сар., 2001).

VP1, VP4 и VP6 су укључени у процесе репликације и транскрипције вирусне РНК која увек остаје у вирусном језгру и на тај начин је потпуно недоступна имунолошком систему (Mertens и Diprose, 2004).



Слика 2. Шематски приказ вируса плавог језика

[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bluetongue_Virus_\(BTV\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bluetongue_Virus_(BTV))

Вирус кодира синтезу неструктурних протеина (NS1, NS2, NS3 и NS4) чија улога није још сасвим разјашњена. Постојећи подаци указују да је NS1 укључен у процес вирусне морфогенезе (Owens и сар., 2004). NS2 протеин је главна компонента вирусних инклузионих телашаца (Schwartz-Cornil и сар., 2008), а одговоран је такође и за активност информационе РНК у процесу репликације (Roy, 2008). NS3 протеин повећава пропустљивост ћелијске мембране и тиме омогућава лакше ослобађање вирусних честица из ћелија инсеката или сисара (Roy, 2008; Nan и Harty, 2004). Исти протеин омогућава и ослобађање вирусних честица пупљењем из ћелија инсеката у којима није уочен цитопатогени ефекат (Schwartz-Cornil и сар., 2008). Улога NS4 још увек није расветљена, верује се да омогућава вирусу да избегне снаге имунолошког система домаћина. Наиме, интактни NS4 у поређењу са мутираним обликом, омогућава ефикаснију репликацију вируса у ћелијама домаћина и у присуству интерферона (Ratinier и сар., 2011).

Реасортирање сегмената вирусне РНК могуће је у случају инфекције ћелија домаћина са неколико различитих серотипова или сојева захваљујући сегментарној природи вирусног генома (Belyaev и Roy, 1993; Batten и сар., 2008). Овакви процеси леже у основи вирусног диверзитета (Carpі и сар., 2010) праћеног промјенама вируленције и серолошких карактеристика вируса (Mertens и сар., 1989; Batten и сар., 2008).

2.3. Патогенеза катаралне грознице оваца

Вирус катаралне грознице оваца се уноси у крвоток домаћина преко пљувачке женки векторских врста из рода *Culicoides* у току њиховог храњења. Наиме, након убода инфицираног вектора, вирус се транспортује преко дендритичних ћелија из лимфе коже до локалног лимфног чвора који је место иницијалне вирусне репликације. Након тога вирус се шири на разна ткива, а примарна репликација се одиграва у ендотелним ћелијама капилара и моноклеарним ћелијама што узрокује даље ширење вируса циркулацијом доводећи до примарне виремије која омогућава инфекцију секундарних органа, нпр. лимфних чворова, слезине, плућа, срца и црева. Након 4-6 дана од момента

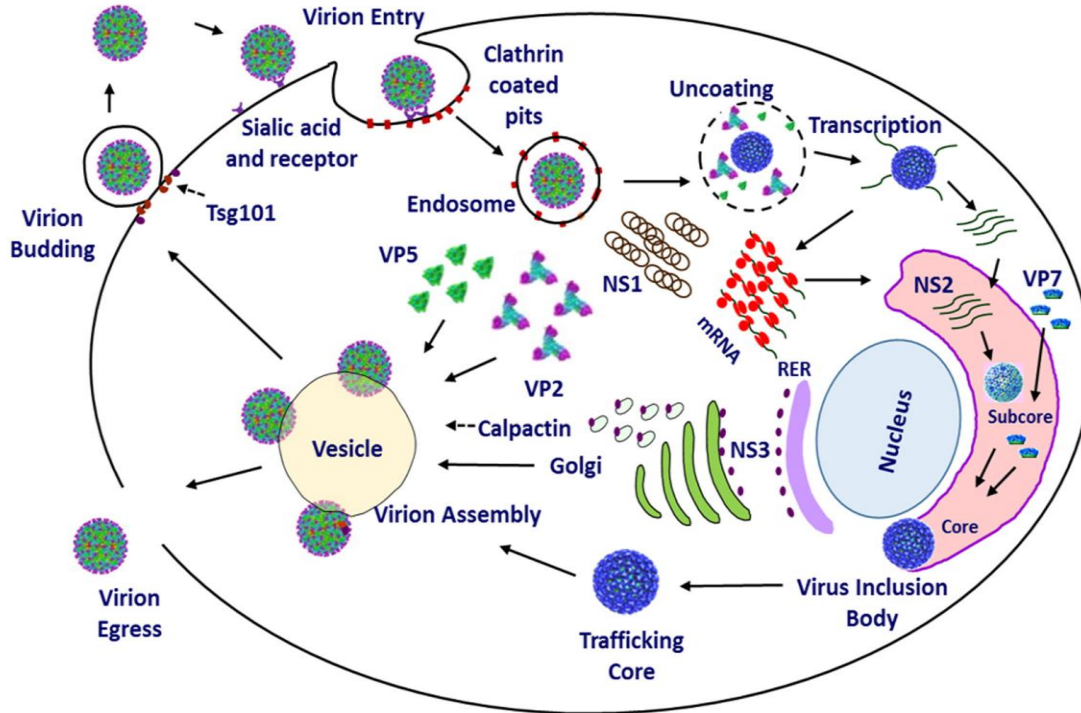
инфекције вирус катаралне грознице оваца се може детектовати у наведеним органима (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1994; MacLachlan, 2004). Већина инфицираних ћелија слезине се налази на перифиерији лимфоидних фоликула (MacLachlan и сар., 1990). Плућа оболелих животиња су врло често едематозна и инфламирана са умерено израженом инфилтрацијом лимфоцита, плазма ћелија и еозинофила. Вирус у срцу није везан за мишићне ћелије већ се налази у капиларима као што се налази у капиларима језика, усана и коже (Dargel и сар., 2012). Инфекција ендотелних ћелија доводи до повећаног пермеабилитета крвних капилара што узрокује инфламаторну реакцију и развој јаког едема (Chiang и сар., 2006). Вирус катаралне грознице оваца узрокује на крају некрозу и апоптозу ћелија (Barratt-Boyes и сар., 1992; Mortola и сар., 2004). Вирус, такође индукује синтезу TNF α , IL1, IL6, IL8, IFN-I и циклооксигеназе-2, повећава концентрацију простациклина и тромбосана што све заједно узрокује снажну инфламаторну реакцију са последичним оштећењем ћелија и ткива домаћина (DeMaula и сар., 2001, 2002; Schwartz-Cornil и сар., 2008; Drew и сар., 2010a). Поредићи одговор ендотелних ћелија у плућима на инфекцију вирусом плавог језика код говеда и оваца откривено је да су продукција вазоактивних медијатора и специфичан однос између простациклина и тромбосана од есенцијалне важности за осетљивост ћелија домаћина (DeMaula и сар., 2001, 2002). Простациклин је вазодилататор и инхибитор агрегације тромбоцита са анти инфламаторном улогом, док је тромбосан вазоконстриктор и стимулатор процеса интраваскуларне коагулације (Cheng и сар., 2002). У физиолошким условима постоји равнотежа између ове две вазоактивне супстанце. Код инфицираних говеда и оваца однос тромбосана према простациклину иде у корист овог првог што је нарочито изражено код оваца (DeMaula и сар., 2002). Ово иде у прилог чињеници да је обољење говеда знатно ређе праћено симптомима него што је то случај код оваца које манифестују често веома тешку клиничку слику. Патогенеза се генерално карактерише оштећењима малих крвних судова у циљним ткивима која доводе до васкуларне оклузије и последичних инфаркта. Вирус индукује синтезу наведених вазоактивних медијатора у тромбоцитима, дендритичним ћелијама, макрофагама и инфицираним ендотелним ћелијама што има за последицу њихово оштећење, повећање

пропустљивости због чега настају крварења и едеми (MacLachlan и сар, 2009). У раним фазама виремије вирус се везује за све ћелије крви и концентрација вируса у свакој ћелијској фракцији је пропорционална броју сваког ћелијског типа. Вирус је због тога највише везан за тромбоците и еритроците, али због кратког живота тромбоцита вирус остаје везан за еритроците што је карактеристика касније виремичне фазе током које је вирус смештен у секвестрима мембране еритроцита у којој је заштићен од имунолошког одговора (MacLachlan и сар., 1990, 2009, 2004). Вирусне партикуле се налазе у циркулацији секвестриране у инвагинацијама мембране еритроцита што омогућава дугу виремију у присуству неутрализирајућих антитијела (MacLachlan, 2004). Низак титар слободног вируса се налази у плазми искључиво у иницијалним фазама инфекције (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1994).

2.4. Репликација вируса катаралне грознице оваца

Животни циклус вируса катаралне грознице оваца се карактерише свим фазама које се срећу и код осталих вируса, а обухватају улазак вируса у ћелију, његову репликацију, формирање и ослобађање нових вируса из ћелије. Инфекција ћелије настаје везивањем вируса за површину ћелије, тачније гликопротеинске молекуле чији је саставни део сијалинска киселина, а који су носиоци хемаглутинационе активности (Eaton и Cramer, 1989). Након тога следи клатрин посредована ендоцитоза на који начин вирус улази у ћелију (Forzan и сар., 2007). VP2 је најперифернији протеин вирусног капсида те је због тога први протеин који интерагује са околином у којој се вирус налази (Hassan и сар., 2001; Zhang и сар., 2010). Подаци добијени секвенцирањем и имунолошком профилацијом указују на велику варијабилност VP2 између свих 26 серотипова (Maan и сар., 2007, 2011). Неутрализирајућа антитела могу бити синтетисана користећи само пречишћени VP2 вируса (Huisman и сар., 1987a). Верује се да иницијално везивање вируса за ћелије настаје као последица неспецифичних интеракција између вируса и површинских молекула ћелије као што су набој и хидрофобност. Вирус се уноси ендоцитозом која је посредована са VP2 и VP5 који се могу детектовати у раним ендозомима. Оба протеина се брзо одвајају од површине вируса и само се језгро

вируса ослобађа из ендозома у цитоплазму. Улогу фузионог протеина има VP5 који подлеже конформацијској промени у условима ниског рН, омогућавајући ослобађање спољашњег капсида од VP7 протеина (Forzan и сар., 2004; Zhang и сар., 2010). Процеси транскрипције и репликације вирусног генома се одвијају унутар вирусног језгра у цитоплазми ћелије домаћина при чему вирусна РНК никада не напушта језгро због чега остаје препозната у ћелији и заштићена од дејства ћелијских нуклеаза (Diprose и сар., 2002). Proteini VP1, VP4 и VP6 представљају репликациони протеински комплекс (Mertens и Diprose, 2004). Због грађе генома вируса катаралне грознице оваца постоји ограничење кад је у питању доступност темплата за транскрипцију због чега је неопходно да вирус енкодира хеликазу која ће омогућити расплитање дволанчане вирусне РНК и одвајање транскрипта од темплата РНК. Управо ту улогу игра VP6, најмањи протеин из транскрипционог комплекса који је значајно мањи од VP1 и VP4 (Mr 36 kDa) (Staubert и сар., 1997). VP1, највећи протеин вируса плавог језика (150 kDa) делује као РНК зависна РНК полимераза која омогућава транскрипцију ланца генома и настанак информационе РНК (Boyce и сар., 2004). VP4 врши метиловање на 5' крају сваког ланца информационе РНК (Martinez-Costas и сар., 1998; Ramadevi и сар., 1998), а онда се таква информациона РНК истискује кроз поре VP3 слоја у цитоплазму где, захваљујући ћелијским транслационим капацитетима уследи синтеза ВТВ протеина. Неструктурни протеин NS1 формира тубуле, а NS2 учествује у формирању вирусних инклузионих телашаца у којима се налази све што је потребно за изградњу вирусног језгра. Кад се изгради, вирусно језгро напушта инклузионо тело и транспортује се на егзоцитотским везикулама захваљујући интеракцији NS3 и једног мембранског транспортног протеина (calpactin). Да би се комплетирао вирусна честица потребан је још спољашњи протеински капсид сачињен од VP2 и VP5 након чијег додавања вирусне честице напуштају ћелију или пупљењем које је омогућено интеракцијом ћелијског протеина Tsg101 са NS3 или се вирусне честице једноставно ослобађају након комплетне лизе домаћинске ћелије. Ти процеси су приказани на слици 3.



Слика 3. Механизам инфекције ћелије домаћина, репликација вируса и напуштање ћелије
https://www.google.rs/search?q=mehanizam+infekcije+ovaca+plavim+jezikom&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjv5dTqnOHMAhVzb5oKHYzeBSsQ_AUIB#tbm=isch&q=bluetongue+virus&imgsrc=-5IjkY6VgpDVBM%3A

Вирус енкодира синтезу једноланчаних РНК транскрипата на основу којих се синтетишу вирусни протеини. Ови вирусни протеини су неопходни за формирање вируса, њихову матурацију и ослобађање. На основу једноланчаних РНК у току транслационог процеса синтетише се дванест протеина од којих је седам структурних (Боусе и Роу, 2007). Сваки сегмент енкодира појединачни протеин са изузетком сегмента 9 који енкодира два протеина (VP6 и NS4) (Ratinier и сар., 2011) и сегмента 10 који енкодира две изоформе истог протеина (NS3 и NS3а) зависно од места почетка транслације (French и сар., 1989; Mertens и сар., 1984).

Табела 2. Вирус катаралне грознице оваца енкодирани протеини и њихова улога
(величина се односи на серотип 10, Patel и Roy 2014)

Сегмент-bp	Енкодирани протеини - kDa	Функција протеина
S1 (3944)	VP1 (150 kDa)	РНК зависна РНК полимераз
S2 (2926)	VP2 (111 kDa)	Везивање рецептора и улаз у ћелију
S3 (2772)	VP3 (103 kDa)	Локализација комплекса вирусне полимеразе
S4 (2011)	VP4 (76 kDa)	Метиловање на 5' крају ланца РНК - "капа"
S5 (1769)	NS1 (64 kDa)	Стимулатор транслационог процеса
S6 (1638)	VP5 (59 kDa)	Протеин мембранског пермеабилитета
S7 (1156)	VP7 (38 kDa)	Рецептор везујући протеин за <i>Culicoides</i> ћелије
S8 (1124)	NS2 (42 kDa)	Формирање инклузионих тела
S9 (1046)	VP6 (36 kDa) NS4 (17 kDa)	Хеликаза Одговор вируса на интерферон
S10 (822)	NS3 (26 kDa) NS3A (25 kDa)	Излазак вируса из ћелије

У инфицираним ћелијама NS1 протеин формира велике тубулске структуре у раној фази вирусне репликације (Roy, 1989). Тубули се појављују два до четири сата након инфекције када се уосталом могу запазити и други протеин. Тубули су углавном везани са инклузионим телима у почетним фазама инфекције, а касније су расути готово по целој ћелији (Huismans и Els, 1979). Ако се прекине или поремети синтеза тубула неминовно долази до промене начина изласка вируса из инфициране ћелије (Owens и сар., 2004). Употребом антитела против NS1 показано је да вирус сисарске инфициране ћелије не напушта лизом већ пупљењем кроз ћелијску мембрану. Као последица тога запажа се врло слаб цитопатогени ефекат него у случају кад су тубули интактни. Инфициране ћелије инсеката не испољавају

цитопатогени ефекат упркос чињеници да су NS1 тубули знатно присутни што указује да је неки други фактор одговоран за процес напуштања ћелије домаћина пупљењем (Owens и сар., 2004). NS3 протеин је такође знатно присутан у инфицираним ћелијама инсеката и однос NS1 и NS3 је знатно већи него у ћелијама сисара. Утвђено је да NS3 подржава ослобађање вируса из ћелије пупљењем посредством *calpastin* зависног егзоцитотског пута (Beaton и сар., 2002). Сматра се да од односа NS1 и NS3 зависи на који начин ће вируси напустити ћелију. Висок однос NS1:NS3 водиће ћелију у лизу, а низак однос NS1:NS3 ће условити ослобађање вируса из ћелије пупљем кроз ћелијску мембрану (Owens и сар., 2004). Функција NS3 као трансмембранског протеина у процесу вирусне репликације је била прилично нејасна мада се знало да је битан за вирусну морфогенезу, а што је закључено ценећи његово здруживање са вирионима како током процеса пурификације тако и интрацелуларно (Eaton и сар., 1988; Owens и сар., 2004). Најновија истраживања указују да NS1 протеин има способност да на специфичан начин подржава експресију вируса катаралне грознице оваца енкодираних протеина делујући као позитивни регулатор транслационог процеса. Подаци указују да NS1 игра круцијалну улогу у регулацији експресије вирусних гена допуштајући “повлашћену” експресију вируса катаралне грознице оваца транскрипата интеракцијом са константном секвенцом на њиховом 3’ крају на који начин је узпирана транслациона машинерија ћелије (Boyce и сар., 2012; Matsuo и Roy, 2013). Вирус катаралне грознице оваца изазива значајан интерферонски одговор којим у ћелији може доћи до блокаде процеса синтезе протеина при чему би NS1 могао вирусу катаралне грознице оваца транскриптима омогућити да превазиђу овај одговор специфичном подршком њихове експресије у ћелијама домаћина (Ruscanu и сар., 2012).

Као последица вирусне инфекције појављују се густе тачкасте формације перинуклеарне локализације које су назване вирусна инклузиона телашца и места су “монтаже” вируса (Brookes и сар., 1993; Каг и сар., 2007). NS2 протеин је неопходан за процес њиховог настанка и задужен је за регрутацију свих протеина неопходних за склапање вирусног језгра, као и једноланчаних РНК молекула, а вероватно и неких фактора домћинске ћелије што резултира формирањем

инклузионих телашаца (Каг и сар., 2007). NS2 има велики афинитет према једноланчаној РНК док се за дволанчану РНК не везује (Thomas и сар., 1990). Наведени протеин има три места за везивање са једноланчаном РНК и то на N терминалном регион резидуе од 1-7, у средини резидуе од 153-166 и на С терминалном регион резидуе од 274-286 и сваки од ових домена се разликује у афинитету према једноланчаној РНК (Fillmore и сар., 2002). Захваљујући овом високом афинитету за једноланчане молекуле РНК, NS2 иницира формирање вирусног језгра интерагујући са VP3 протеином што има за последицу “регрутацију” VP7 (Каг и сар., 2007). NS2 протеин такође везује и VP1 који је битна компонента транскрипционог комплекса (Modrof и сар., 2005). У самим инклузионим телашцима NS2 “регрутује” једноланчане молекуле РНК који интерагују са VP1, VP4 и VP6 комплексима који се на крају обмотају са VP3 и VP7 на који начин се формира вирусно језгро у коме се онда врши синтеза секундарног РНК ланца унутар инклузионог телашца (Lymperopoulos и сар., 2003).

Вирусно језгро се формира унутар инклузионог телашца, али се не додају вирусни протеини VP2 и VP5 спољашњег капсида што је неопходно за матурацију вирусне честице (Каг и сар., 2007). Спољашњи капсидни протеини VP2 и VP5, мали протеин језгра VP6 и неструктурни NS3 протеин интерагују са липидним компонентама мембране указујући на значај ових мембранских микродомена у матурацији и ослобађању вирусних честица (Bhattacharia и Roy, 2010). Ови микродомени, богати холестеролом и сфинголипидима, налазе се у мембранским структурама саме ћелије и одговорни су за концентрацију специфичних протеина као што су сигнални молекули, гликозилфосфатидилинозитол (GPI) везани протеини као и мембрански трафикинг протеини неопходни за матурацију вирусних честица и њихово ослобађање из ћелије (Helms и Zurzolo, 2004; Lingwood и Simons, 2010). VP5 протеин поседује високо конзервиране секвенце чијим прекидом долази до поремећаја у везивању са поменутиим липидним компонентама у ћелијској мембрани сисара (Bhattacharya и Roy, 2008). Ако се делује са специфичном фосфатазом на фосфатидилинозитолбисфосфат PI(4,5)P₂ присутан у ћелијској мембрани, доћи ће до инхибиције нормалног сазревања ВТВ без утицаја на експресију ВТВ протеина (Bhattacharya и Roy, 2008). Истовремено, неће

постојати способност везивања вирусних честица за спољашњу мембрану везикуларних структура у цитоплазми ћелије (Bhattacharia и Roy, 2013). PI(4,5)P₂ игра кључну улогу у везикуларном трафикингу омогућавајући формирање ендо и егзоцитотских интрацитоплазматичних везикула и њиховом повезивању са цитоскелетом посредством активације актина и његове полимеризације што у случају деплеције PI(4,5)P₂ инхибира формирање интрацелуларних везикула и сходно томе транспорт ново синтетисаних BTV честица (Caroni, 2001; Di Paolo и сар., 2004). Ко-локализација NS3 протеина са PI(4,5)P₂ липидним мембранским структурама и његова способност да интерагује са оба спољашња протеина вирусног капсида указује да би NS3 могао играти важну улогу у повезивању новоформираних BTV језгара и спољашњих протеина капсида у циљу формирања зреле вирусне честице (Bhattacharya и Roy, 2008; Bhattacharia и Roy, 2007; Celma и Roy, 2011). Сматра се да се овај процес одвија на липидним мембранским структурама егзоцитотских везикула током којег настаје матурација вирусних честица и њихово ослобађање из ћелије (Domitrovic и сар., 2013; Meng и Lever, 2013). Вирус се ослобађа из ћелије у екстраћелијски простор како би се даље преносио на друге ћелије. Устаљено је мишљење да се вируси без омотача ослобађају из ћелије лизом, али се показало да BTV може покренути механизам пупљења кроз ћелијску мембрану (Feng и сар., 2013). Литичка инфекција се јавља код сисарских ћелија индукујући појаву цитопатогеног ефекта док је инфекција векторских ћелија нелитичка (Celma и Roy, 2011; Hyatt и сар., 1989). Једини мембрански протеини који су енкодирани од стране BTV су NS3 (229 ам.кис) и његова краћа форма NS3A (216 ам.кис.) (French и сар., 1989; Lee и Roy, 1986). Ови протеини садрже дугачке N терминалне и краће C терминалне цитоплазматичне домене који су у вези са два трансмембранска домена везана помоћу кратке екстрацелуларне петље (Bansal и сар., 1998). Ова петља садржи место за гликозилацију на аспарагину-позиција 150 и протеин *in vivo* може егзистирати у негликозилираном и гликозилираном облику (Bansal и сар., 1998; Beaton и сар., 2002).

Резидуе од 1-14 N терминалног цитоплазматичног домена NS3 молекула специфично интерагују са S100A10/p11 (Beaton и сар., 2002) који је Ca неосетљив

члан фамилије S100 који формира хетеротетрамерне комплексе са два тешка ланца анексина II те формира calpastin комплекс у еукариотским ћелијама који је укључен у транспорт протеина (Rescher и Gerke, 2008). С терминални крај реагује специфично са спољашњим капсидним протеином VP2 што указује да NS3 има улогу “моста” који омогућава везивање са транспортном машинеријом ћелијске мембране (Bhattacharya и сар., 2007; Celma и Roy, 2011).

NS4 неструктурни протеин је не тако давно идентификован као продукт ORF сегмента 9 (Ratinier и сар., 2011) и који се састоји од 77-79 аминокиселина, а високо је конзервиран међу различитим BTV серотиповима (Ratinier и сар., 2011). Његова улога још није разјашњена, али постоје индикације да је одговоран за способност вирусне реакције на интерферон. Присуство интактног NS4 омогућава ефикаснију репликацију вируса у ћелијама изложеним дејству интерферона тип I у поређењу са NS4 делетираним мутантима (Ratinier и сар., 2011). Недавно је откривено присуство још једног ORF који одговара 50-59 кодон дугом ORF, сегмента 10, а који је конзервиран међу BTV изолатима (Sealfon и сар., 2015).

2.5. Виремија и имунолошки одговор

Инфициране животиње имају пролонгирану, али не сталну виремију (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1995; Bonneau и сар., 2002; Melville и сар., 2004). Трајање виремије зависи од животињске врсте, расе и директно зависи од дужине живота еритроцита за које се вирус веже (MacLachlan и сар., 2009) Виремија код оваца и коза европских раса настаје од трећег до шестог дана након инфекције и траје до 27-54 од момента инфекције. Виремија достиже максималне вриједности у периоду од 13 до 17, односно 20-ог дана од момента инфекције. Експериментални подаци указују да нема значајне разлике у дужини трајања виремије између оваца (34,6 дана) и коза (36,7 дана), али источно медитеранске расе малих преживара имају дужу виремију (41,3 дана) него остале расе (30,4) (Koumbati и сар., 1999). Виремија код говеда траје дуже, и до 100 дана због чега су говеда са епидемиолошке тачке гледишта веома значајна (Sellers и Taylor, 1980). Вирус се може детектовати у крви инфицираних животиња и до шест месеци од момента

инфекције, док инфективни вирус може бити изолован до два месеца после инфекције (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1994; Bonneau и сар., 2002; Koumbati и сар., 1999). Нуклеинска киселина вируса се може детектовати методом PCR из крви инфицираних говеда и оваца и по неколико месеци након што више није могуће изоловати вирус у ћелијској култури нити инфицирати пријемчиве овце. Чак шта више, крв преживара која садржи нуклеинске киселине детектоване методом PCR, а која није инфективна тј. негативна на вирус изолацији, није инфективна ни за векторе било да се хране њоме или им се апликује интраторакално (Bonneau и сар., 2002; MacLachlan, 1994; MacLachlan и сар., 1994; Tabachnick и сар., 1996). Крв преживара из које се методом PCR може доказати присуство нуклеинских киселина вируса, али из које се вирус не може изоловати је неинфективна за остале преживаре (MacLachlan и сар., 1989; MacLachlan и сар., 1994).

Инфициране животиње реагују продукцијом интерферона, активацијом хуморалног и целуларног имуног одговора (MacLachlan и Thomson, 1985; MacLachlan, 1994). Инфицирани преживари брзо развијају антитела у високом титру као одговор на стимулацију различитим вирусним протеинима. Серотип специфична неутрализирајућа антитела су усмерена против VP2 и могу бити детектована серум неутрализационим тестом (De Maula и сар., 2000). Продукција неутрализирајућих антитела се, у мањем степену, може индуковати и са VP5 (Roy и сар., 1992; Lobato и сар., 1997). Серуми инфицираних преживара такође садрже и серогрупна специфична антитела индукована од стране VP7 као и антитела против осталих структурних и неструктурних протеина (MacLachlan и сар., 1987; Richards и сар., 1988; MacLachlan, 2004). Антитела усмерена против VP7-протеина вирусног језгра, као и осталих структурних и неструктурних протеина могу се детектовати агар гел имунодифузионим тестом и компетитивним имуноензимским тестом (с-ELISA). Позитиван серолошки резултат потврђује да је животиња била инфицирана вирусом, али није доказ тренутне инфекције те у областима где има болести највећи део серопозитивних јединки није инфициран (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1995; Bonneau и сар., 2002; Gibbs и Greiner, 1994; MacLachlan и сар., 1994; Singer и сар., 2001; Tabachnick и сар., 1996). Ћелијски имунолошки одговор на BTV инфекцију показује унакрсну реактивност између серотипова (Ghalib и сар., 1985) и

делује негативно на ширење вируса у организму, али га не може елиминисати у потпуности (MacLachlan, 1994; Barratt-Boyes и сар., 1995) и у томе најзначајнију улогу играју CD8⁺ Т-лимфоцити (MacLachlan, 1994; Barratt-Boyes и сар., 1995, Schwartz-Cornil и сар., 2008). Т-лимфоцити пренесени из ductus thoracicus инфициране овце у реципијента обезбеђују делимичну заштиту против инфекције хомологим и хетерологим серотиповима вируса катаралне грознице оваца потврђујући чињеницу да су Т-ћелије носиоци унакрсне заштите која нема везе са Б-лимфоцитима и продукцијом антитела (Jeggo и сар., 1984). Унакрсна реактивност између хетерологих вируса катаралне грознице оваца сојева чији су носиоци Т-ћелије није у корелацији са унакрсном реактивношћу између сродних серотипова чији су носиоци неутрализирајућа антитела (Takamatsu и Jeggo, 1989).

Takamatsu и сар. (2003) су указали да би вирус катаралне грознице оваца могао перзистирати у $\gamma\delta$ Т-ћелијама у кожи инфицираних оваца, на који начин би вирус могао да преживи зимски период. Доказано је да код природно инфицираних говеда вирус не перзистира у $\gamma\delta$ Т-ћелијама коже. Лимфоцитне ко-културе у ћелијским линијама фибробласта коже нису показале присуство вируса катаралне грознице оваца. Овим је потврђено да није потребно ограничавати кретање серопозитивних поствиремичних говеда јер таква говеда нису перзистентно инфицирана (Takamatsu и сар., 2003). Пошто кожа представља највећи орган и те како је значајна као место репликације вируса. Репликација вируса катаралне грознице оваца се одвија у ендотелним ћелијама капилара коже и моноклеарним леукоцитима присутним у кожи, као и дендритичним ћелијама већ трећег дана после инфекције. Не само да $\gamma\delta$ Т-ћелије буду инфициране вирусом него и остале субпопулације моноклеарних леукоцита. Детекција протеина вируса катаралне грознице оваца у лимфатичним органима и ендотелним ћелијама крвних капилара коже указује да се репликација одвија симултано на овим местима (Dargel и сар., 2012). Иако инфекција са вирусом катаралне грознице оваца узрокује снажну виремију код инфицираних преживара, ниво репликације у већини инфицираних органа је прилично низак у поређењу са нивоима репликације у случају инфекције са другим вирусима као што је нпр. вирус слинавке и шапа (Monaghan и сар., 2005). Јако изражена виремија одсликава јако изражени тропизам вируса према

ендотелним ћелијама капилара којих има у огромном броју и ћелијама које су широко заступљене у целом организму (различите субпопулације леукоцита). Насупрот томе, неки вируси се интензивно реплицирају у ћелијама свега неколико органа или на неколико специфичних репликационих места као нпр. вирус слинавке и шапа у базалним слојевима епитела језика и меког непца (Monaghan и сар., 2005) или Ротавируси у зрелим апикалним ћелијама на ресицама танког црева (Ramig, 2004). Лимфни чворови главе и тонзиле садрже велики број инфицираних ћелија који као и кожа нису били препознати као важна места репликације вируса (Pini, 1976; Barratt-Boyes и MacLachlan, 1994; MacLachlan и сар., 1990; Lawman, 1979). Утврђено је да се вирус репликује и у слезини (Worwa и сар., 2010). Присуство велике количине вируса у слезини у фази виремије је последица њене улоге резервоара крви. Касније током инфекције, вирусне партикуле су уклопљене у ћелијске мембране еритроцита и тако могу бити скривене од антитета. Могу се доказати вирус изолацијом и PCR, техникама које не праве разлику између присуства вируса и његове репликације те остаје дилема да ли су вирусне честице у слезини у великом броју последица интензивне репликације или једноставно последица присуства вируса у циркулацији (Barrat-Boyes и MacLachlan, 1995; MacLachlan, 1995).

Разлике које постоје у клиничкој манифестацији болести код говеда и оваца се повезују са различитом пријемчивошћу њихових ендотелних ћелија (De Maula и сар., 2001; De Maula и сар., 2002). Ендотелне ћелије из појединих ткива домаћина сисара показују разлике у пријемчивости на инфекцију са BTV или AHSV и сходно томе разлике постоје и у имуном одговору (Gomez Villamandos и сар., 1999; De Maula и сар., 2002; Russell и сар., 1996). Варијације у пријемчивости ендотелних ћелија у оквиру различитих органа инфицираног домаћина би могле бити одговорне за тропизам вируса према одређеним органима и појаву хеморагија. Ендотелне ћелије у кожи, лимфним чворовима главе, тонзилама и уснама могу бити пријемчивије на инфекцију, па су тако и места репликације вируса у раним фазама инфекције. Међутим, када се успостави висок ниво виремије и ендотелне ћелије слабије пријемчивих органа (срце, мишићи, јетра и бубрези) такође могу постати инфективне. У свим органима у којима је постојало петехијално крварење

инфициране ендотелне ћелије су детектоване имунофлуоресценцијом указујући да инфекција ендотелних ћелија може бити бар делом одговорна за појаву крварења (Dargel и сар., 2012). Степен ткивних оштећења у појединим органима није само рефлексија броја инфицираних ендотелних ћелија и леукоцита. За многе хеморагичне грознице укључујући и катаралну грозницу оваца од значаја је и дисфункција ендотела која барем неким делом доприноси настанку индиректних имуних одговора организма и синтези вазоактивних и/или проинфламаторних медијатора и/или поремећаја коагулације (Gomez Villamandos и сар., 1999; Aleksandrowicz и сар., 2008; MacLachlan и сар., 2008; Talavera и сар., 2004). Оштећење ендотела, као последица индиректних инфламаторних механизма пре него директно оштећење ћелија вирусом, доприноси хеморагичним лезијама и ткивним едемима (Dargel и сар., 2012). Једини орган где се хистолошки уочена оштећења не рефлектују на ниво анатомских промена и клиничку дисфункцију јесу плућа. Хистолошки се запажа лимитиран ниво смрти ендотелних ћелија, периваскуларни и перибронхијални едеми. Међутим, увећани интерстицијални притисак може “померити” едем у оближње зоне са нижим притиском као што су алвеоле и телесна дупља, па се течност постепено губи што има за последицу да пулмонарни едем буде веома благ и хистолошки неупадљив. Такође, индиректна васкуларна оштећења настала посредством инфламаторних медијатора би могла играти важну улогу у настанку разлика између озбиљног анатомског и клиничког плућног едема и ограниченог оштећења ендотелних ћелија које се детектује хистолошки (Dargel и сар., 2012).

Пошто се вирус репликује у кожи, она постаје локални извор инфективних вируса, а уз то је вирус присутан у крвним капиларима коже као резултат виремије. Вектори се не хране директно крвљу већ узрокују мала оштећења коже у којима се налази лимфа, ћелије коже и крв (Hocking B., 1971). Репликацијом вируса у кожи обезбеђује се локални извор инфективних вируса за векторске инсекте осим тога што је вирус присутан у капиларном систему коже као резултат системске виремије. Вектори такође могу користити длаке као оријентир у току храњења те инфекција капилара око перифоликуларних жлезда као и самих жлезда има значаја за инфекцију вектора (Dargel и сар., 2012).

2.6. Патолошке промене код катаралне грознице оваца

Патолошке промене које се налазе код катаралне грознице оваца у вези су са васкуларним оштећењима, тромбозом, хеморагијама и повећаном васкуларном пропустљивошћу. Јављају се поткожни желатинозни едеми на глави, хеморагије у мишићном слоју пулмоналне артерије и аорте, хиперемија, а повремено и цијаноза оралне мукозе са петехијама и екхимозама. Ерозије са некротичним ткивом могу да се појаве на уснама језику и образима. Хиперемија и крварења у румену и ретикулуму су чест налаз. Лимфни чворови, тонзиле и слезина су увећани и хеморагични. Крварења се могу наћи на корену језика, перикарду, бубрезима, цревима нарочито на илеоцекалном споју и поткожном ткиву. На скелетној и срчаној мускулатури се могу понекад запазити мала некротична поља. Уз то, могу се јавити и запаљенски процеси у горњим партијама респираторног тракта, плућни едем, пенушави садржај у трахеји и бронхусима, плеуритис, перикардитис са накупљањем течности у перикардијалној дупљи и ентеритис (Tweedle и Mellor, 2002; Dagrel и сар., 2007; Маугоу и сар., 2008; MacLachlan и сар., 2009).

Крварења на бази пулмоналне артерије и некрозе на папиларним мишићима леве коморе се сматрају патогномоничним променама које не морају увек да буду присутне.

Хистолошке промене укључују хипертрофију капиларног ендотела, периваскуларне едеме и инфилтрацију скелетне и срчане мускулатуре макрофагима и лимфоцитима, васкуларну конгестију са следственим ткивним инфарктима који узрокују хипоксију ткива и ћелијску десквамацију. У акутним случајевима скелетна и срчана мускулатура су често захваћене некротичним процесима, који у хроничним случајевима резултирају мононуклеарном ћелијском инфилтрацијом и фиброзом (Brodie и сар., 1998; Tweedle и Mellor, 2002; MacLachlan и сар., 2009).

2.7. Клинички симптоми код катаралне грознице оваца

Катарална грозница оваца се код оваца манифестује у акутној, субакутној и хроничној форми. Инкубациони период траје од четири до осам дана (Tweedle и Mellor, 2002), након чега се јавља грозница праћена високом температуром која често прелази 40°C, а достиже и до 42°C. Убрзо уследи апатија, тахипноја, појављује се хиперемија у пределу носног огледала и усана праћена појачаном саливацијом. У почетку се јавља бистри серозни исцедак из носа који убрзо прелази у мукопуруленти. Његовим сасушивањем у пределу ноздрва настају крaste. Појављују се едеми на језику, уснама и субмандибуларном подручју, а понекад и на ушима. Петехије се јављају на коњунктивама, а често и улцерације на слузокожи уста. Не тако често може да се уочи цијанотичан језик. Оболене јединке често држе отворена уста са протрузијом језика. У неким случајевима може се јавити отежано дисање, профузна хеморагична дијареја и повраћање које каткад може узроквати настанак аспирационе пнеумоније. При крају фебрилне фазе често се запажа појава коронитиса, ламинитиса, затим парезе и некрозе попречнопругасте мускулатуре чему доприноси недостатак воље за кретањем и неправилан став са погрбљеним леђима. Могу се јавити тортиколис, дерматитис и местимични недостатак вуне (Brewer и MacLachlan, 1994; Tweedle и Mellor, 2002; Dargel и сар., 2007; Elbers и сар., 2008а, 2009; Kirschvink и сар., 2009). Инфекција gravidних оваца може довести до побачаја, мумификације фетуса или рођења слабашне младунчади са честим конгениталним дефектима као што су церебралне цисте, ретинална дисплазија, хидроцефалус, итд. (Osburn и сар., 1971; Osburn, 1994; MacLachlan и сар., 2000; Tweedle и Mellor, 2002; Saegerman и сар., 2011). У хроничној форми болести животиње могу настати друге болести као што је бактеријска пнеумонија (MacLachlan и Gard, 2009). Код оваца са ензоотских подручја болест је прилично блага и често прође као инапаратна инфекција. Заправо, болест може бити испољена као абортивна форма код које, након фебрилне фазе, нема развоја локалних лезија и као субакутна форма код које су лезије минималне, али је изражена слабост и дуг период реконвалесценције са

могућношћу појаве секундарних бактеријских инфекција. Животиње које се коначно опораве имају веома малу економску вредност (Radostitis и сар., 2007).

Козе не оболевају тако често као овце и ретко се развија клиничка слика. Ако се развију симптоми, слични су онима код оваца, али нису тако озбиљни. Током 2006. године избила је епидемија у Холандији, а оболеле козе су имале изненадни пад продукције млека, потом високу температуру, едем усана и главе, носни исцедак и красте на носу и уснама, еритем коже вимена и мала поткожна крварења (Derckens и сар., 2007).

Код говеда је клиничка манифестација болести врло ретка (Tweedle и Mellor, 2002) са изузетком инфекције узроковане са BTV-8 током које су многе животиње испољиле симптоме болести (Elbers и сар., 2008b). Сматра се да инфекција са клиничком манифестацијом настаје као последица развоја хиперсензитивне реакције посредоване имуноглобулинима класе Е (Anderson и сар., 1987). Болест је у почетку праћена температуром, апатијом, депресијом, а потом се јављају ерозије и некрозе оралне и назалне слузнице. Такође се јавља исцедак из носа, интензивна саливација, коњунктивитис, шепавост и укоченост, улцеративни дерматитис, коронаритис, повремено пролив са примесам крви, едем и хиперемија. Кожа на сисама је често упаљена са пукотинама и љуспицама (Tweedle и Mellor, 2002; Thiry и сар., 2006; Williamson и сар., 2008; Elbers и сар., 2008a, 2009). Млечне краве смањују продукцију млека (Thiry и сар., 2006; Mehlhorn и сар., 2008; Elbers и сар., 2009). Инфекција у раном стадијуму гравидитета може резултирати раним ембрионалним морталитетом са ресорпцијом ембриона. Такође, може доћи до побачаја или доношења на свет авиталних телата са малформацијама (MacLachlan и сар., 2000; Tweedle и Mellor, 2002; Elbers и сар., 2008a; Desmecht и сар., 2008). Ако гравидне женке преживе, фетуси инфицирани између 70 и 130 дана гестације имају малформације на централном нервном систему попут хидроцефалуса и разних церебралних дефеката, док они инфицирани неколико недеља пре доласка на свет обично показују симптоме блажег енцефалитиса (Waldvogel и сар., 1992; MacLachlan и сар., 2000).

Код белорепих јелена, слично као код епизоотске хеморагијске болести јелена, акутна болест се манифестује хеморагичном дијатезом која је последица

дисеминоване интраваскуларне коагулације (Waldvogel и сар., 1992; MacLachlan и сар., 2000). Болест се карактерише интензивним хеморагијама на нивоу целог организма, отоком главе и врата, појачаном саливацијом, хеморагичним носним исцетком и крвавом дијарејом (Radostis и сар., 1994; Howerth и сар., 2001).

Разлике које се јављају у клиничкој симптоматологији су везане за старост, расу и сој инфективног вируса. Иако су млађе јединке пријемчивије на инфекцију (што је вероватно у вези са стеченим имунитетом код одраслих) много тежу клиничку слику имају одрасле овце (Elbers и сар., 2008). Такође је утврђено да постоје разлике у пријемчивости између појединих раса оваца (Gibbs и сар., 1994). Европске расе оваца као што су Мерино и Дорсет су високо пријемчиве, али је и индивидуална пријемчивост од великог значаја за појаву и манифестацију обољења (Dargel и сар., 2007).

2.8. Дијагностика катаралне грознице оваца

Прелиминарна дијагноза заснована на клиничким знацима, патоморфолошким променама и епидемиолошкој процени се потврђује лабораторијским испитивањем (Afshar, 1994) из разлога што постоје и друге болести које се карактеришу отоцима и крварењима. Дијагностичке методе имају за циљ да идентификују животиње које су инфициране или су биле инфициране вирусом. Постављање позитивне дијагнозе обично укључује идентификацију антигена или антитела вирусолошким, серолошким и молекуларним дијагностичким техникама (OIE, 2014). За постављање поуздане дијагнозе лабораторији се морају доставити адекватни узорци.

Од живих животиња– пуна крв са антикоагулансом (EDTA). Крв се не замрзава него се доставља у расхлађеном стању. Процесом замрзавања се лизира еритроцитна мембрана што доводи до ослобађања вируса који, уколико у крви постоје антитела, може да буде инактивисан. Стерилно узета пуна крв може на собној температури да се транспортује неколико дана, а на 4°C може да се чува дуг временски период.

Од угинулих животиња– слезина, јетра, лимфни чворови, плућа, коштана срж, а када је индиковано срце и скелетна мускулатура док се од фетуса доставља мождано ткиво (Stott и сар., 1983; Parsonson, 1990; Afshar, 1994; Tweedle и Mellor, 2002).

Крвни серум може да се замрзава и чува на -20°C , а изоловане ћелије крви у 10% диметил сулфоксиду захтевају температуру чувања -70°C (Thomas, 1984).

Лабораторијске процедуре у дијагностици болести плавог језика су: методе изолације вируса, методе идентификације вируса и серолошке методе (OIE, 2014).

Вирус катаралне грознице оваца се може изоловати из крви, сперме, епитела слузница и ткива различитих органа као што су јетра, слезина, лимфни чворови и мозак. Вирус је веома стабилан при неутралном рН и може бити успешно изолован из узорака крви чуваних на 4°C дуже од годину дана. Изолација се спроводи интраваскуларном инокулацијом ембрионираних кокошијих јаја, инокулацијом оваца и церебралном инокулацијом мишева. Након иницијалне инокулације нпр. ембрионираних кокошијих јаја, вирус се адаптира на ћелије сисара (ВНК-21 или VERO ћелије). Изолација и адаптација вируса омогућавају добијање веће количине материјала неопходне за даља испитивања и карактеризацију вируса (вирус неутрализациони тест, секвенционирање целог или дела вирусног генома, анализу секвенци итд.) (Saegerman и сар., 2008).

Најсензитивнија метода изолације вируса је интравенска инокулација ембрионираних кокошијих јаја. Користе се 9 до 12 дана стара ембрионирана кокошија јаја (OIE, 2004). Ова метода је 100 до 1000 пута сензитивнија него инокулација жуманцетне кесице (Goldsmith и Barzilai, 1985), али је прилично захтевна по питању техничких вештина и искуства (Clavijo и сар., 2000).

Вирус катаралне грознице оваца се такође може изоловати на ћелијским линијама пореклом од инсеката, као што су КС ћелије пореклом од *Culicoides sonorensis* или С6/36 ћелијска линија пореклом од *Aedes albopictus* (AA) ћелија (Wechsler и McHolland, 1988).

Показало се да је примарна инокулација КС ћелијске линије пореклом од вектора такође врло сензитивна (McHolland и Mecham, 2003). Међутим, цитопатогени ефекат се запажа само на ћелијама пореклом од сисара трећег до

петог дана након инокулације (Clavijo и сар., 2000). Изолацији вируса у ћелијским културама обично претходи пасаж на ембрионираним кокошијим јајима која су много осетљивија на ВТВ него ћелијске линије (Afshar, 1994; Clavijo и сар., 2000). Инокулација оваца се ретко примењује и то само у случајевима када узорак садржи веома низак вирусни титар (Afshar, 1994; ОИЕ, 2004).

Најпрактичнији метод за идентификацију вируса је реакција ланчане полимеразе са реверзном транскрипцијом (RT-PCR) којом се идентификује вирусна рибонуклеинска киселина (РНК). Ова метода омогућава брзу идентификацију вирусне рибонуклеинске киселине из крви и ткива инфицираних животиња и до шест месеци након инфекције (Katz и сар., 1994; MacLachlan и сар., 1994). Поред детекције вирусне нуклеинске киселине методом RT-PCR може да се одреди и серотип вируса за свега неколико дана од пријема узорка. Традиционалне методе које се базирају на изолацији вируса и следственој серолошкој идентификацији вируса захтевају и до четири седмице за вирусну изолацију и идентификацију. Предности RT-PCR технике су брзи резултати, висока сензитивност и специфичност због чега се ова метода и најчешће користи у лабораторијама. Пошто се овом методом детектује специфична нуклеинска киселина вируса, резултати се морају пажљиво интерпретирати јер постојање нуклеинске киселине не мора да значи да у организму егзистира инфективни вирус. Методом RT-PCR може да се детектује нуклеинска киселина у крви инфицираних оваца и говеда 30 до 90 дана од момента престанка инфективности, односно могућности изолације. Дакле, у оваквим случајевима детекција вирусне нуклеинске киселине указује на скору инфекцију што не значи да је у организму присутан инфективни вирус. Препоручена метода за идентификацију вируса је real-time RT-PCR која је сензитивна и представља брз начин детекције вируса са могућношћу квантификације вируса што ову методу чини методом избора у дијагностици. Њоме се могу идентификовати сви серотипови и сојеви вируса узročника плавог језика (ОИЕ, 2015).

Циклично секвенцирање и добијање секвенце дела РНК вируса, особито варијабилног сегмента 2, омогућава, коришћењем електронске базе података секвенци, упоређивање добијених секвенци са секвенцама већ карактерисаних

вируса. На овај начин се потврђује не само серотип детектованог вируса него је омогућена и идентификација посебних вирусних линија те откривање потенцијалног географског порекла као и генотипизација и топотипизација (Jimenez-Clavero M.A. и сар., 2006; Orru G. и сар., 2006; Shad и сар., 1997; Shaw и сар., 2007).

Поред молекуларних постоје и друге, много ређе коришћени методе, за детекцију вируса као што су: агар гел имуно дифузија (AGID), Ag-ELISA, флуоресценција, VNT, итд (OIE, 2015).

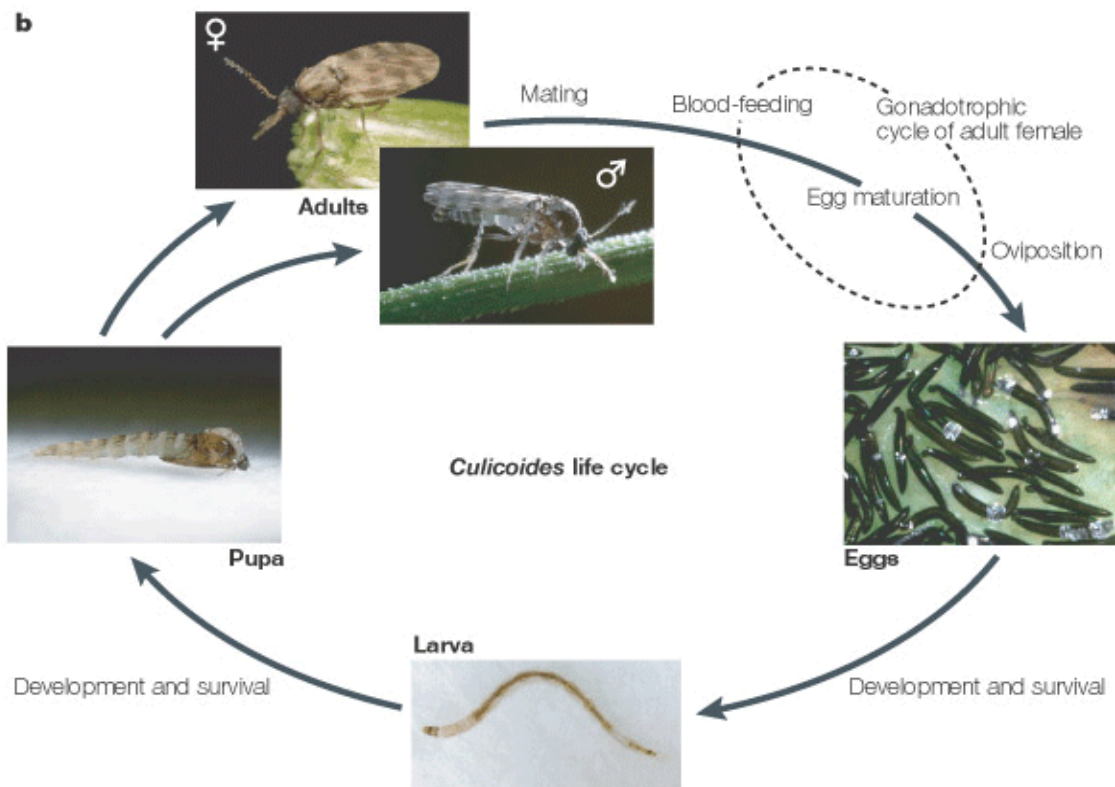
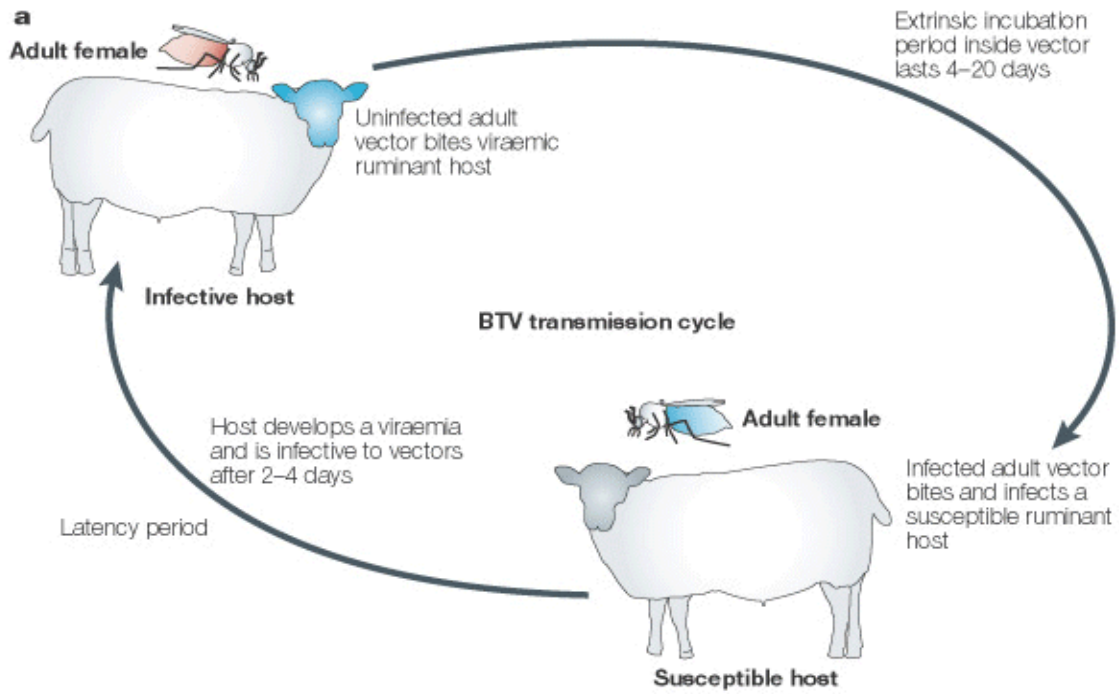
Као резултат инфекције вирусом катаралне грознице оваца у крви се појављују антитела. Њиховим доказивањем се индиректно доказује изложеност организма вирусу. Антитела се појављују 7 до 14 дана након инфекције и перзистентна су. За детекцију серогрупних антитела односно антитела специфичних за све серотипове вируса катаралне грознице оваца, као и за детекцију серотип специфичних антитела користе се различите методе. Серогрупна антитела нису неутрализирајућа и иако су значајна за дијагностику њихова улога још није сасвим јасна. Серотип специфична антитела су неутрализирајућа и обезбеђују заштиту само против истог серотипа (Hamblin, 2004). Групно специфична антитела се могу детектовати следећим тестовима: реакцијом везивања комплемента (RVK), агар гел имунодифузионим тестом (AGID) и компетитивним имуноензимским тестом (сELISA). AGID јесте једноставан за извођење, јефтин и не захтева неку посебну опрему, али главна мана му је недостатак специфичности. Наиме, не прави разлику између Орбивирус антитела па позитивна реакција може значити инфекцију и са другим Орбивирус врстама. Компетитивна ELISA техника је препоручена метода за детекцију антитела против вируса плавог језика јер има добру сензитивност и специфичност у односу на остале тестове, а и врло је ефикасна у детекцији антитела у раним фазама инфекције. Њоме се детектују искључиво специфична антитела против катаралне грознице оваца. Специфичност је резултат примене моноклонских антитела специфичних за серогрупу. Иако различита, ова антитела се сва везују за аминотерминални регион главног протеина вирусног језгра (VP7) и такмиче се са антителима из серума за места везивања (Kramps и сар., 2008; OIE, 2015). Постоје разни комерцијални ELISA китови којима

се детектују антитела у серуму или узорцима млека (Mars и сар., 2010). Међутим, највећу специфичност и сензитивност од свих тестова има серум неутрализациони тест који је технички и временски врло захтеван и скуп за извођење (Hamblin, 2004). Њиме се детектују серотип специфична вирус неутрализирајућа антитела и одређује се титар. Способност идентификације серотипа одговорног за епидемију је од значаја за предузимање адекватних контролних мера као што је вакцинација. Реакције унакрсне неутрализације се могу појавити код животиња које су већ биле инфициране вирусом што резултира појавом антитела која реагују на серотипове са којима животиња није долазила у контакт. Метода се заснива на интеракцији познате концентрације испитиваног серума са фиксном количином вируса за сваки појединачни серотип. Неутрализација се детектује биолошки на пријемчивим ћелијским културама (Saegerman и сар., 2008; ОИЕ, 2015).

2.9. Ширење катаралне грознице оваца

Катарална грозница оваца није контагиозна болест и основни услов за ширење болести је присуство хематофагних инсеката из рода *Culicoides* који обухвата више од 1400 различитих врста распрострањених широм света. Извори инфекције су инфицирани преживари у фази виремије и инфицирани вектори из рода *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*), те тако појава болести зависи од истовременог присуства компетентног векторског преносиоца и пријемчивог преживара (Mellor и сар., 2000; Wolkent, 2005). Иако су куликоиди широко распрострањени, најзаступљенији су у топлим, влажним подручјима са доста блата, која обилују органским материјама и где живе домаћини на којима се вектори хране. Период њихове највеће активности почиње сат времена пре заласка сунца и престаје сат времена након изласка сунца (Mellor и сар., 2000). Развојни циклус куликоида траје од две до шест недеља (Veronesi и сар., 2009), директан је и обухвата јаја, четири ларвена стадијума, лутку и одрасли облик (Mellor и сар., 2000). Одрасли облици обично живе од 10 до 20 дана, али могу живети и до 90 дана у хладнијим условима (Mellor 2000; Lysyk и Danyk, 2007). Овце су главни домаћин вируса, мада је инфекција говеда такође честа и значајна, јер говеда углавном не

испољавају клиничке симптоме те на тај начин представљају скривене резервоаре вируса. Овце и говеда се сматрају инфективним до 60 дана од момента инфекције иако већина инфекција траје 2 до 4 недеље (ОИЕ, 2015).



Слика 4. Развојни циклус *Culicoides* spp.(b) и трансмисиони циклус (a)

Нешто око 30 врста је значајно са векторског аспекта и обично су једна до две врсте значајне за један ендемски простор (Meiswinkel, 2004). Главни вектор у Африци је *Culicoides imicola*, у САД *Culicoides variipennis* осим југоисточног дела где је присутан *C. insignis*. У Централној и Јужној Америци вектори су *C. pucillus*, *C. insignis*, *C. pusillus*, *C. filarifer*. У Азији и на Средњем Истоку су заступљени *C. fulvis*, *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. nudipalpis* и *C. orientalis*, а у Аустралији се јављају *C. wadai*, *C. actoni*, *C. brevitarsis*, *C. peregrinus*, *C. oxystoma*, *C. brevipalpis* и *C. fulvus*. У Европи улогу вектора имају *C. imicola* (јужна), *C. obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. dewulfi* и *C. chiopterus* (Radostis и сар., 2007). Постоји мишљење да би одређене *Culicoides* врсте могле бити компетентни вектори само за специфичне серотипове (Tabachnick, 2004). Тако, *C. sonorensis* има улогу вектора катаралне грознице оваца у Северној Америци за серотипове ВТВ-10,-11,-13,-17 док *C. insignis* преноси серотипове ВТВ-1,-3,-6,-8,-12,-14 у Јужној Америци (Lager, 2004; Tabachnick, 2004). Такође је утврђено да је серотип ВТВ-2 изолован само у јужним деловима САД што је вероватно у вези са специфичним односом овог серотипа и вектора *C. insignis* који се не јавља у северним деловима САД (Gibbs и Greiner, 1994; MacLachlan, 2011). Постојање специфичних компетентних вектора везаних за одређено географско подручје и одређени серотип вируса говори о значају интеракције између домаћина и вектора у одређеним условима околине (Tabachnick, 2004). Најранију претпоставку да је катарална грозница оваца преносива преко инсеката поставио је Spreull давне 1905. године, а уочио је да се катарална грозница оваца јавља у топлом периоду године и да престаје са доласком јесени и зиме. Стада која су се напасала на већим висинама и која су затварана током ноћи као и животиње које нису острижене су биле много резистентније на инфекцију (Spreull, 1905). Године 1944. du Toit је експериментално инфицирао овце хомогенатом пореклом од вектора који су се хранили на инфицираним животињама. Овце су оболеле од плавог језика што је био доказ да је болест векторске природе (du Toit, 1944).

Док се мужјаци куликоида хране биљним соковима женке се хране крвљу домаћина и потребан је бар један оброк да се комплетриа оваријални циклус. Хране се ноћу, а оптимална температура за њихову активност је између 13°C и 35 °C.

Вирус стиже до црева и инфицира цревне ћелије, репликује се у њима и долази до пљувачних жлезда. Цели циклус од инфекције до момента кад се вирус пљувачком може пренети на домаћина траје од 10 до 15 дана на 25°C. Једном инфицирани куликоиди остају инфицирани цели свој живот тј. неколико недеља. Максимални вирусни трансмисиони потенцијал куликоиди постижу 6 до 14 дана након ингестије вiremичне крви (Mellor, 2000, 2004). *C. sonorensis* је једна од најчешћих векторских врста куликоида. Стопа трансмисије болести преко овог вектора је екстремно висока и довољан је само један угриз инфицираног вектора да пренесе инфекцију на природне домаћине (Baylis и сар., 2008). Међутим, преношење вируса са инфицираног домаћина на векторског преносиоца је мање успешно. Одмах након храњења на инфицираним домаћинима у експерименталним условима преко 70% векторских преносилаца је имало детектабилни вирусни титар, али је само 0,6% било инфицирано вирусом (Baylis и сар., 2008) што указује на присуство одређених баријера у самим векторима које ограничавају вирусни раст или ширење на пљувачне жлезде у којима се вирус репликује пре преношења на домаћина. Такве баријере су потврђене код *C. varipennis*, а спречавају настанак инфекције црева односно лимитирају ниво репликације вируса у ћелијама црева и дисеминацију вируса из хемоцела до места одговорних за секундарну вирусну репликацију што ову врсту чини прилично рефрактарном (Fu и сар., 1999). Осетљивост појединих векторских преносилаца на инфекцију вирусом је резултат генетског устројства и укрштање различитих популација куликоида резултира настанком или јако пријемчивих или рефрактарних инсеката (Jones и Foster, 1974; Mellor, 1990). Способност куликоида у преношењу инфекције је зависна од амбијенталне температуре, влажности ваздуха и сезонских падавина. Вирус се у векторима може репликовати на температуре изнад 15°C (Mellor, 2000) при чему интензитет репликације расте са порастом температуре (Van Dijk и Huisman, 1982). Глобалне климатске промене које се карактеришу порастом температуре су омогућиле дужу активност куликоида, а тиме и утицале на продужење њихове трансмисионе моћи (Tweedle и Mellor, 2002). Више температуре које последњих година погађају Северну Европу су увећале значај аутохтоних куликоида у преношењу болести плавог језика (Gale и сар., 2009; MacLachlan, 2010). У

умереним областима одрасли облици куликоида обично не преживе прве мразеве па болест плавог језика има сезонски карактер (Radostis и сар., 1994) са пиковима у пролеће и јесен (Purse и сар., 2005). Куликоиди се хране на животињама на отвореном, али неке врсте као што су *C. dewulfi* и *C. obsoletus* и у затвореном простору што нарочито долази до изржаја при паду температуре (Baldet и сар., 2008). Куликоиди могу активно да прелете раздаљине од око 2 km, али због њихове мале величине (1mm до 3 mm) лако се преносе ветром па је забележено да се пасивно ветром могу транспортовати на удаљености и до 700 km (Ducheune и сар., 2007). Један од најраспрострањенијих куликоида је *C. imicola* који као термофилна врста захтева за свој опстанак просечну амбијенталну температуру изнад 12°C односно изнад 15°C колико је потребно за репликацију у њиховом организму. Највећу активност имају у темепратурном интервалу од 13°C до 35 °C (Tweedle и Mellor, 2002). Размножавају се на влажном земљишту које има доста природног ђубрива (Meiswinkel и сар., 1994), а хране на преживарима и коњима (Mellor и Wittmann, 2002). *C. imicola* је нађен у Африци, јужној Азији, Португалији, Шпанији, Турској, Грчкој, на Кипру и Корзици, у Италији, Израелу, Јемену, Оману и другим земљама (Mellor, 1990). Не живи у северној и централној Европи где доминирају психрофилне врсте куликоида као што су *C. obsoletus*, *C. pulicaris* и друге врсте као потенцијални преносиоци вируса (Melhorn и сар., 2007). Серотип 8 је био узрочник епидемије која је погодила Немачку 2006-2007 године, а векторски преносилац је био *C. obsoletus* (Mehlhorn и сар., 2007), врста из које је вирус изолован још 1977 године током епидемије која је погодила Кипар (Mellor и Pitzolis, 1979), а касније Италију (Savini и сар., 2005), Холандију (Meiswinkel и сар., 2008) и поново Немачку (Hoffmann и сар., 2009). На Сицилији и у Немачкој вирус је изолован из *C. pulicaris* (Caracarra и сар., 2003; Hoffmann и сар., 2009), а у Холандији из *C. dewulfi* и *C. chiopterus* (Dijkstra и сар., 2008). *C. obsoletus* је једна од најзаступљенијих врста у централној и северној Европи (Tweedle и Mellor, 2002) и заједно са *C. scoticus* припада *Obsoletus* комплексу (Savini и сар., 2004). Женке ове две врсте су морфолошки веома сличне што отежава њихову диференцијацију (Campbel и Pelham-Clinton, 1960; Savini и сар., 2005), али је идентификација могућа употребом молекуларних метода (Nolan и сар., 2007; Stephan и сар., 2009). *C. obsoletus* за своје

размножавање бира места са влажним опалим лишћем, шупљине дрвећа испуњене водом и гомиле ђубрета (Анонимно, 2007). *C.pulicaris* и *C.punctatus* припадају *Pulicaris* комплексу (Carpenter и сар., 2006; Hoffmann и сар., 2009) који за своје размножавање тражи влажна тресетишта (Анонимно, 2007). Широко су заступљени у централној и северној Европи као и *C.obsoletus*, али вероватно имају минорну улогу у преношењу болести (Mehlhorn и сар., 2009). Женке *Obsoletus* и *Pulicaris* комплекса врло радо нападају говеда (Bartsch и сар., 2009; Ninio и сар., 2011). Појава *C.dewulfi* се везује за узгој говеда и коња чији стајњак представља идеално место за њихову репродукцију (Campbell и Pelham-Clinton, 1960; Meiswinkel и сар., 2007). *C.chiopterus* је такође копрофилна врста, преферира исхрану на говедима и коњима (Campbell и Pelham-Clinton, 1960; Zimmer и сар., 2008).

Катарална грозница оваца се углавном преноси преко куликоида, али постоје изузеци. Заправо, вирус катаралне грознице оваца је изолован из неких врста крпеља и комараца, међутим доказано је да су они само механички вектори без значаја за епидемиологију болести (Radostis и сар., 1994). Сперма бикова у виремичној фази која садржи црвене и/или беле крвне ћелије за које је вирус везан може бити извор инфекције (Osburn, 1994; Wilson и сар., 2008). Трансплацентарно преношење вируса се јављало код оваца које су биле вакцинисане живим вакциналним сојевима који су претходно прошли вишеструке пасаже на ембрионираним кокошијим јајима или ћелијским културама. У вези са једном вакциналном кампањом у Калифорнији регистрован је знатан број побачених јагњади са церебралним деформитетима који су имали за последицу изостанак сензоријума и кретање у круг (Schultz и Delay, 1955). Овце које су биле вакцинисане живим атенуираним сојевима вируса катаралне грознице оваца између 30 и 80 дана гестације су доносиле на свет јагњад са конгениталним деформитетима чији је степен варирао у зависности од периода гестације. Експериментална инфекција вакциналним сојем 40-ог дана гестације је имала за последицу појаву хидраненцефалије и субкортикалних циста у мозгу, а инфекција 75-ог дана је изазвала појаву фокалних лезија и поренцефалију. Вирус катаралне грознице оваца природно не погађа зреле нервне ћелије, већ се репликује у прекурзорским неуронским и глијалним ћелијама лоцираним у субependимском

слоју пре њихове миграције у церебрални кортекс. Вирус тада доводи до лизе недиференцираних ћелија узрокујући појаву некрозе и хидраненцефалије (Osburn и сар., 1971a; Osburn и сар., 1971b; Osburn, 1994). У каснијим фазама гестације једине пријемчиве ћелије су недиференциране глија ћелије. Код говеда, најосетљивији период за индукцију настанка малформација је између 70 и 85 дана гестације (Waldvogel и сар., 1992). Трансплацентарни пренос вируса се примарно односи на култивацијски адаптиране сојеве па се адекватним вакциналним програмима избегава спровођење исте у осетљивом период гестације. Ипак, када је серотип 8 погодио северну Европу утврђено је да вирус пасира плаценту у више од 10% случајева. Поред тога што је вирус изазвао висок морбидитет и морталитет, сазнање да се преноси трансплацентарно на потомство има посебан значај са аспекта вирусне перзистенције у популацији и његовог преживљавања током зимских месеци (Gibbs и сар., 1979; Wilson и сар., 2008). Пореди вертикалну трансмисију вируса код експериментално инфицираних оваца серотипом BTV-8 и серотипом BTV-2 утврђена је знатно фреквентнија плацентарна трансмисија серотипа 2. Могуће је и да остали серотипови односно сојеви имају способност пролаза плацентарне баријере барем у експерименталним условима (Rasmussen и сар., 2013).

2.10. Презимљавање вируса катаралне грознице оваца

У умереним областима постоји период од неколико месеци током којих нема нових инфекција. Међутим, догоди се да следеће године болест опет избије што говори да постоји начин да вирус презими. Феномен презимљавања још није довољно разјашњен. Постоји више хипотеза односно потенцијалних механизма који омогућавају презимљавање вируса, а свде се на могућност презимљавања у домаћинима односно векторима. Вертикална трансмисија вируса у куликоидима се сматра могућим механизмом презимљавања у умереним областима за време зимског периода. Наиме у умереним областима највећи број куликоида зиму преживи у виду ларви четвртог степена, а вирусна РНК је доказана у ларвеним стадијумима куликоида, али ипак трансфер вируса на ларве није доказан (White и

сар., 2005). Вирус може да преживи и без вишемесечног (9-12 месеци) присуства одраслих вектора (Wilson и сар., 2007). Иако је животни век куликоида прилично кратак и износи око 20 дана (Mellor, 2000), они повремено могу поживети и до три месеца (Lysyk и Danyk, 2007). Током зиме 2006-2007 године која је била изузетно блага у Европи (Wilson и сар., 2008) изванредан број одраслих куликоида је забележен у Белгији (Losson и сар., 2007) што говори да под повољним условима неки куликоиди могу живети довољно дуго да преживе период између две векторске сезоне (Wilson и сар., 2008). Током *in vitro* испитивања показано је да вирус може перзистентно инфицирати овчије Т лимфоците, процес који се могуће јавља током природне инфекције и виремије код сисара обезбеђујући тако перзистенцију вируса (Takamatsu и сар., 2003). Међутим, ова хипотеза није потврђена (Lunt и сар., 2006; Wilson и сар., 2008). Вирус би могао преживети зиму и у организму говеда са пролонгираном виремијом која понекад може трајати и до 100 дана (Sellers и Taylor, 1980). Презимљавање вируса може бити у вези и са латентном инфекцијом (Luedke и сар., 1977). Постоји могућност да код говеда трансплацентарни пренос вируса омогућава његово преживљавање у периоду кад нису присутни одрасли куликоиди (Wilson и сар., 2008). Механички преносиоци могу такође имати значајну улогу у презимљавању вируса јер је вирус катаралне грознице оваца изолован из неких врста крпеља (Stott и сар., 1985; Bouwknecht и сар., 2010), који живе знатно дуже него куликоиди. С друге стране, вирус је након ингестије крви од стране крпеља пасирао цревну баријеру и путем лимфе стигао до пљувачних жлезда, оваријума и тестиса што је доказано помоћу PCR методе. ВТВ-8 је нађен у различитим ткивима *Ixodes* врста и *Ornithodoros savignyi*, а утврђена је и његова трансстадијална (*Ixodes*) и трансваријална пасажа (*Ornithodoros savignyi*) што указује на њихов потенцијални векторски капацитет (Bouwknecht и сар., 2010).

2.11. Животињске врсте пријемчиве на инфекцију вирусом катаралне грознице оваца

Сви преживари су пријемчиви на инфекцију вирусом катаралне грознице оваца, али се озбиљна клиничка манифестација болести јавља код оваца и код белорепих јелена (Howerth и Tyler, 1988; Parsonson, 1990; Johnson и сар., 2006). Говеда која играју веома значајну улогу у епидемиологији катаралне грознице оваца због веома дугог виремичног периода, углавном не испољавају клиничке симптоме и болест протиче субклинички (Tweedle и Mellor, 2002). Међутим током епидемије у централној и северној Европи серотип ВТВ-8 је довео до испољавања клиничких симптома болести (Thiry и сар., 2006; Darpe и сар., 2007; Elbers и сар., 2008a). Катарална грозница оваца се у природи јавља код камелида (Rivera и сар., 1987; Meyer и сар., 2009) и слонова (Erasmus, 1990; Mushi и сар., 1990). Под одређеним околностима катарална грозница оваца се може пренети на карниворе. Код паса инфекција је довођена у везу са употребом контаминираних вакцина (Wilbur и сар., 1994; Everman, 2008). Инфекција је регистрована и код евроазијских рисова (*Lynx lynx*) из Белгијског зоолошког врта који су храњени побаченим фетусима преживара из фармског узгоја (Jauniaux и сар., 2008). Специфична антитела на катаралну грозницу оваца су откривена у серумима афричких карнигора као што су: лавови, гепарди, шакали, дивљи пси, хијене и цибетке (Alexander и сар., 1994). Присуство антитела се објашњава чињеницом да у природном ланцу исхране предатори конзумирају месо и органе животиња инфицираних вирусом плавог језика. У крви црног медведа и пуме који настањују Флориду и јужни део САД утврђено је присуство антитела (Dunbar и сар., 1998) као и код домаћих паса (Howerth и сар., 1995).

2.12. Фактори везани за домаћина који утичу на појаву катаралне грознице оваца

Вирус катаралне грознице оваца може инфицирати све врсте домаћих преживара, али се озбиљне клиничке манифестације болести јављају код оваца.

Уколико се овце инокулирају крвљу вирусних животиња, генерално ће се болест развити са јасно израженом клиничком сликом, док ће се код говеда у том случају испољити врло блага клиничка слика (Bekker и сар., 1934; Spreull, 1905). Значајне разлике у морбидитету и морталитету између инфицираних оваца и говеда имају се приписати разликама у степену изражених микроваскуларних лезија насталих код ових животиња (Russel и сар., 1996). Уколико се козе инокулирају инфективном крвљу неће се развити клиничка слика чак и ако се инфицирају крвљу након вишеструких пасажа (Bekker и сар., 1934; Erasmus, 1975, Spreull, 1905). Рани експерименти су указали на велику разлику у морбидитету и морталитету између аутохтоних афричких и европских раса оваца (Spreull, 1905). Дорсет раса оваца се сматра изузетно пријемчивом на вирус катаралне грознице оваца (Jeggo и сар., 1987). Такође, мерино, сардинијска и источно фризијска раса су веома пријемчиве и развијају тешку клиничку слику са знатним процентом морталитета у поређењу са афричким или азијским расама као што су Аваси и Дамани (Cox, 1954; Sellers, 1984). Међутим, обољење са озбиљном клиничком сликом је запажено и код аутохтоних раса оваца у Судану и Ираку (Sellers, 1984). Недавна испитивања потврђују раније установљене чињенице да су овце и козе пријемчиве на инфекцију, да овце манифестују озбиљну клиничку слику насупрот козама. Нивои вирусне инфекције код овца што потврђује чињеницу да се вирус катаралне грознице оваца интензивно репликује у организму коза, али се оштећење ћелија индуковано директним дејством вируса или имунолошким одговором домаћина не јавља. Коришћене су инфективне дозе које су вишеструко изнад оних у природној инфекцији (2×10^6 PFU) (Carogale и сар., 2014) док су дозе ($10^{1.4}$ TCID₅₀) биле довољне да инфицирају овце (van Gennip и сар., 2012). Међутим, неке експериментално инфициране козе са холандским серотипом BTV-8 су развиле благу клиничку слику са температуром и вирусним титром (Coetzee и сар., 2013). Други експерименти у којима је коришћен серотип BTV-4 изолован на ембрионираним кокошијим јајима и пасиран неколико пута на ВНК₂₁ су показали да је једна од 11 инфицираних коза испољила пролазну температуру, док 10 од 12 оваца није испољило никакве клиничке симптоме (Koumbati и сар., 1999) што указује да су

фактори везани за домаћине кључни за клиничку манифестацију болести. Нису уочене неке значајне разлике у пријемчивости на вирус између оваца медитеранске области и оних из централне и северне Европе упркос разликама које постоје међу њима те се разлике у пријемчивости појединих раса данас не наглашавају као раније (Carogale и сар., 2014). Међутим, битно је нагласити да значајне разлике у одговору на инфекцију вирусом катаралне грознице оваца постоје у оквиру саме расе што је увези са генетским устројством и имунолошким статусом јединки. Показало се да овце мерино расе инокулиране инфективном крвљу показују различиту клиничку слику која варира од благе, пролазне грознице до фаталног исхода (Neitz, 1948). Главни утицај на морбидитет и морталитет током инфекције вирусом катаралне грознице оваца имају претходна изложеност вирусу и присуство неутрализирајућих антитела. Тиме се и објашњава настанак епидемије у случају кад се овце интродукују у ендемске области као што је био случај са увозом мерино оваца у Јужноафричку Републику или где се на новом простору вирус први пут појављује (Jeggo и сар., 1983; Schwartz-Cornil и сар., 2008). Уз то, симултана инфекција са другим патогенима може деловати супресивно или сензибилизирајуће доводећи до појаве јако изражене пријемчивости на вирус или развоја тешке инфламаторне реакције (Howell и сар., 1970). Уколико се телад третирају дексаметазоном пре инокулације вируса долази до манифестације озбиљних симптома у експерименталним условима што говори да је урођени имунитет делом одговоран за степен резистенције према вирусу катаралне грознице оваца (Hourigan и Klingsporn, 1975a). Испитиван је и утицај старости на избијање клиничких манифестација болести код инфицираних животиња. Јагњад од мајки чији имуни систем није долазио у контакт са вирусом катаралне грознице оваца су веома осетљива на инфекцију, али манифестују блаже клиничке симптоме у поређењу са онима који се јављају код старијих животиња (Neitz, 1948). Bekker у својим радовима наводи да се катарална грозница оваца ретко јавља код телади, а ова очигледна резистенција се објашњава пасивно стеченим имунитетом преко колострума, а и чињеницом да се телад држе у затвореним просторијама чиме су мање изложени куликоидима (Bekker и сар., 1933). Spreull у својим радовима наводи да млада јагњад, особито она у лошој физичкој кондицији, оболевају много

лакше од одраслих и чешће пате од гастроинтестиналних поремећаја пре смртог исхода (Spreull, 1905). Недавна испитивања показују да под стандардизованим експерименталним условима овце расе Дорсет старости осам месеци након инокулације серотипом ВТВ-8 не показују статистичку разлику у укупном клиничком приказу у односу на двогодишње овце исте расе (Carogale и сар., 2014).

2.13. Детерминанте вируленције вируса катаралне грознице оваца

На свеукупну клиничку манифестацију катаралне грознице оваца утичу фактори везани за домаћина, али и они везани за самог узрочника као што су специфични серотип или сој самог вируса (Carogale и сар., 2014; MacLachlan и сар., 2009). Свих 27 познатих серотипова вируса узрокују обољење са разликама у степену манифестације и варијабилне нивое унакрсне заштите. Међутим, акценат је, због његове високе вируленције, посебно стављен на серотип ВТВ-8, иако у Европи годинама перзиситира бар 11 различитих серотипова. Рана експериментална испитивања спроведена инокулацијом оваца са инфективном крвљу која је садржала серотип ВТВ-8 су указала на високу патогеност овог серотипа који је узроковао морталитет и до 72%. У истом експерименту серотип ВТВ-4 вируса генерално није узроковао морталитет. Исто тако нису уочене разлике у вируленцији два соја серотипа ВТВ-3 (Neitz, 1948). Тежина клиничких симптома није обавезно у корелацији са степеном морталитета код оваца. Овце експериментално инфициране серотипом ВТВ-3 су показале благу до средње изражену клиничку слику, али је већина на крају угинула, док оне инфициране серотипом ВТВ-5 манифестују озбиљну клиничку слику, али се углавном опораве (Howell и сар., 1970). Варијације су постојале у експресији клиничке слике и морталитету између других серотипова (ВТВ-4, ВТВ-10 и ВТВ-16) од којих је серотип ВТВ-4 узроковао највећи морталитет (Goldsmith и сар., 1975). Поређењем вируленције сојева пореклом из Аустралије и Јужноафричке Републике утврђено је да су јужноафрички сојеви много патогенији (Hooper и сар., 1996). Серотип ВТВ-8 је показао релативно ниску вируленцију код инфицираних животиња у Израелу

(Brenner и сар., 2010), док је исти серотип изазвао висок морталитет код овацау северној Европи током 2006. Године. Серотип BTV-24 се показао слабо вирулентним у САД, док је у Израелу изазвао велики морбидитет у погођеним стадима (Brenner и сар., 2010; MacLachlan, 2010a). Након једнократних пасажа италијанског соја вируса BTV-2 и северноевропског соја BTV-8 на КС хелијама и двократних пасажа на ВНК-21 хелијама установљен је сличан степен вируленције код оба серотипа. Међутим, утврђена је значајна разлика у вируленцији између италијанског соја BTV-8 и холандског соја истог серотипа при чему је овај други био много вирулентнији (Caropale и сар., 2014). На основу свега може се закључити да припадност одређеном серотипу није поуздана детерминанта патогености неког изолата.

Овце које су експериментално инфициране крвљу природно инфицираних оваца испољавају тежу клиничку слику него оне које су инфициране вирусима изолованим на култури хелија и ембрионираним јајима (MacLachlan и сар., 2008; Eschbaumer и сар., 2010). Овце инокулиране крвљу инфициране овце са BTV-8 испољиле су озбиљну клиничку слику и високе нивое виремије у поређењу са онима инфицираним вирусима изолованим на култури хелија. Мало је вероватно да би фактори присутни у крви били узрок снажне клиничке манифестације болести. Пасажом вируса у култури хелија могу настати адаптивне промене вирусног генотипа са реперкусијама на вируленцију (Caropale и сар., 2014).

Познато је да је VP2 једина детерминанта серотипа што говори да остали протеини моги имати допринос у одређивање патогености специфичних сојева. Кроз природни реасортиман делова генома у оквиру једног домаћина или вектора, вирус катаралне грознице оваца може стећи нове патогене особине нарочито кад постоји више серотипова и сојева вируса у једној области при чему је могућност реасортирања изузетно висока (Maan и сар., 2015; Nomikou и сар., 2015).

Атенуирани сојеви BTV-2,-4,-9 се одликују конзистентним аминокиселинским променама које се појављују у VP1, VP2 и NS2 у поређењу са сродним вирулентним сојевима што би могло инкриминисати ове протеине као детерминанте вирусне патогености с тим што се не искључује могућност да је

атенуација можда и последица специфичних комбинација мутација свих десет сегмената вирусног генома (Carogale и сар., 2011).

Вирус катаралне грознице оваца је снажан индуктор синтезе интерферона како *in vitro* тако и *in vivo* (Doceul и сар., 2014; Vitour и сар., 2014). Интерферон I ($IFN\alpha/\beta$) је кључни играч урођеног антивирусног имунолошког одговора домаћина који испољава антипролиферативне и проапоптотске особине, доприноси матурацији дендритичних ћелија, појачава цитотоксичност NK ћелија, стимулише диференцијацију T цитотоксичних лимфоцита и продукцију високог титра антитела током вирусне инфекције (Deal и сар., 2013). Синтеза интерферона се покреће након детекције вирусних молекула (dsRNA, ssRNA, CpG DNA и гликопротеини) од стране специјализованих ћелијских рецептора (PRRs). Синтетисани интерферони се везују за своје рецепторе што резултира активацијом стотина гена укључених у успостављање антивирусног статуса ћелије. Две су фамилије PRRs укључене у детекцију вируса, TLRs и RLRs. До сада је идентификовано 13 чланова TLR фамилије као екстраћелијских рецептора који се експримирају преко антиген презентујућих ћелија као што су дендритичне ћелије и макрофаге. Међутим њихова експресија није ограничена само на ове ћелије већ и друге ћелије домаћина могу да експримирају бар неке TLRs (Akira, 2006). TLRs су кључни актери антивирусног одговора посебно у дендритичним ћелијама које су међу главним продуцентима интерферона у организму. TLR3, TLR7/8 и TLR9 су најзначајнији TLRs у детекцији вирусних инфекција и специјализовани су за препознавање нуклеинских киселина (Kawai и Akira, 2007; Eisenacher и сар., 2008). Међутим, и вирусни протеини такође могу активирати TLRs (Unterholzner и Bowie, 2008). На основу изнесеног да се закључити да TLRs омогућава ћелијама брз и снажан антивирусни одговор с тим што му је ефикасност ограничена управо због његове дистрибуције. TLRs су локализовани на површини ћелија или у ендозомима те тако не могу опазити вирусе у цитоплазми ћелије. Поред тога TLRs се експримирају углавном на ћелијама носиоцима имунитета (Vitour и сар., 2014). Потврђена је хипотеза да постоји алтернативни систем за интрацелуларну детекцију вирусне репликације чији су носиоци RIG-1 и MDA5 хеликазе као интрацелуларни рецептори способни да индукују продукцију интерферона и

инфламаторних цитокина као одговор на присуство дволанчане РНК у цитоплазми (Andrejeva и сар., 2004; Yoneyama и сар., 2004). Синтетисани интерферони имају улогу не само у успостављању антивирусног статуса ћелије него да преко цитокина умногоме модулирају имунолошки одговор. IFN I делује директно на имуне ћелије, али и индиректно тако што индукује секрецију цитокина и хемокина те тако стимулише специфичне ћелије (Hervas-Stubbs и сар., 2011; Huber и Farrar, 2011). IFN I регулише активност NK ћелија повећавајући њихову способност да уништавају таргет ћелије, а стимулише њихову пролиферацију кроз индукцију IL-15 (Nguyen и сар., 2002). IFN I такође модулише активност макрофага и антиген презентујућих ћелија увећавајући експресију површинских рецептора на овим ћелијама и ко-стимулаторних молекула који интерагују са имуним ћелијама. Заправо, IFN I стимулише експресију МНС I молекула и протеина укључених у процесуирање и презентацију антигена, а све у циљу ефикаснијег препознавања антигена и снажнијег CD8 T-ћелијског одговора. IFN I директно подржава опстанак, пролиферацију и диференцијацију T ћелија у ћелије памтилице и сензибилисане T ћелије (Tough, 2012). Поред тога што IFN I продужава опстанак и активност B ћелија, он модулира и антивирусни одговор чији су носиоци B лимфоцити, директним или индиректним механизмима делујући на стимулацију продукције цитотоксичних и неутрализирајућих антитела (Kiefer и сар., 2012). Како би лимитирали сваки ћелијски одговор усмерен на инхибицију њихове репликације вируси су развили многобројне механизме као што су: инхибиција синтезе IFN I, инхибиција IFN I имунолошког одговора, инхибиција интерфероном индукованих антивирусних фактора итд. (Lee и сар., 2009; Taylor и Mossman, 2012). Већина вируса је способна да индукује синтезу интерферона иако овај процес може знатно варирати у зависности од особина вируса и статуса самог домаћина. Године 1967., Tytel и сар. су доказали да је вирусни геном који се састоји од дволанчане РНК какву имају Реовируси, довољан да стимулише снажну продукцију интерферона. Вирус катаралне грознице оваца који припада фамилији Reoviridae је веома снажан индуктор синтезе IFN што је и доказано на мишевима још 1978 године (Jameson и сар., 1978). Синтеза интерферона *in vivo* током BTV инфекције је иницијално демонстрирана након интравенске инокулације мишева са BTV-10

(Huismans и сар., 1969). Преживари у различитим фазама свог развоја показују способност синтезе IFN као одговор на инфекцију вирусом катаралне грознице (MacLachlan и сар., 1984; MacLachlan и Thompson, 1985). Бовини фетуси експериментално инфицирани 125 дана гестације са BTV-10 синтетисали су IFN чије је присуство регистровано и у ткивима и у серуму, а који лимитира дисеминацију вируса (MacLachlan, 1984). Интравенском инокулацијом телади са BTV-10 добијени су врло високи нивои IFN убрзо након инфекције који су се одржавали максимално 4 дана. Вирусни титар у крви је био већи када није било могуће детектовати интерферон у крви. На основу тога је закључено да је интерферонски одговор првенствено значајан у контроли иницијалних фаза инфекције вирусом катаралне грознице оваца (MacLachlan и Thompson, 1985). Код оваца инфицираних са различитим серотиповима BTV интерферон се у серуму детектује 5 дана после инфекције и достиже максимални ниво 6 дана (Foster и сар., 1991). У исто време се јавља и први виремични врхунац. Ниво интерферона пада деветог дана од момента инфекције, што је у корелацији са другим виремичним врхунцем регистрованим дан касније те произилази закључак да би бифазна виремична слика могла бити резултат синтезе интерферона услед активације имунолошког система (Foster и сар., 1991). У лимфним чворовима коже оваца инокулираних интрадермално са BTV-2 и BTV-8 детектован је увећан ниво IFN I са максималном концентрацијом регистрованом 5-6 дана после инфекције (Ruscapu и сар., 2012). Доказано је да високе дозе интерферона значајно смањују интензитет инфекције јер су IFNAR^{-/-} мишеви дефицијентни у рецептору за IFN подложни леталној BTV инфекцији (Calvo-Pinilla и сар., 2009а). Експерименталном инокулацијом IFNAR^{-/-} мишева са BTV-4 инактивираним вакцином доказано је да се стварају неутрализирајућа антитела против вируса која штите од леталне инфекције. На IFNAR^{-/-} мишевима су вршени експерименти ради процене имуног одговора индукованог са неколико експерименталних рекомбинантних вакцина (Calvo-Pinilla и сар., 2012; Franceschi и сар., 2011; Jabbar и сар., 2013; Ма и сар., 2012). Међутим сви резултати добијени током испитивања ефикасности вакцина и имунолошког одговора добијени на мишјим IFNAR^{-/-} моделима морају се с пажњом интерпретирати због недостатка интерферонског одговора, а потом и

експериментално проверити на природним домаћинима како би се потврдио налаз добијен на мишјим моделима. Инокулацијом различитих ћелијских линија са вирусом катаралне грознице оваца, доказано је и да су нивои синтетисаног IFN различити што би се могло довести у везу са њиховим индивидуалним особинама или способностима вируса да неутралишу синтезу интерферона у одређеним врстама ћелија (Ruscanu и сар., 2012; Chauveau и сар., 2012; Doseul и сар., 2014). Доказано је да вирус катаралне грознице оваца индукује синтезу интерферона у многим хуманим ћелијама, посебно у туморским ћелијским линијама (Chauveau и сар., 2012). Тако, ендотелне ћелије говеда инфициране са BTV-8 показују 2000 пута већу експресију информационе РНК за IFN- β , док инфициране ћелије аденокарцинома плућа код људи дају 10000 пута већу експресију истог интерферона (Chauveau и сар., 2012). Разлика у експресији IFN- β је запажена и током инфекције различитим серотиповима вируса катаралне грознице оваца (Chauveau и сар., 2012) што указује да појединачни серотипови односно сојеви вируса немају исту способност модулације интерферонског одговора у инфицираним ћелијама. Вишеструке пасаже вируса *in vitro* на ћелијама са инсуфицијентним интерферонским системом могу резултирати настанком вируса који имају смањену способност неутрализације интерферонског одговора домаћина што треба имати у виду када се процењује интерферонски одговор специфичних сојева вируса (Perez-Cidoncha и сар., 2014; Janowitz и сар., 2015). Главно место синтезе IFN I након инфекције са BTV су плазмацитоидне дендритичне ћелије (Pascale и сар., 2008). Поред продукције интерферона као резултат BTV инфекције јавља се и инфламаторна реакција која резултира синтезом многих цитокина и молекула који имају утицај на имуни одговор изазван вирусом те је утврђена корелација између индукованих инфламаторних цитокина и патогенезе (DeMaula и сар., 2001,2002). Вирус може индуковати експресију многих гена који кодирају синтезу цитокина (TNF α , IL-6, IL-12) као и површинских молекула CD80/86 на плазмоцитоидним дендритичним ћелијама *in vitro* (Ruscanu и сар., 2012), а снажна експресија гена одговорна за развој инфламаторне реакције је доказана и *in vivo* (Ruscanu и сар., 2013). У не хематопоетским ћелијама вирус се препознаје помоћу RIG-I и Mda5 и инхибицијом ових хеликаза или једног од адаптерских протеина

MAVS узрокује значајно смањење синтезе интерферона (Chauveau и сар., 2012). Синтеза интерферона није индукована ни UV третираним вирусом што указује да је процес репликације вирусне РНК кључна фаза откривања вируса и активације интерферонске каскаде у нехематопоетским ћелијама.

Да би истржили механизам индукције синтезе IFN у плазмоцитоподобним дендритичним ћелијама изложених деловању UV инактивисаног BTV. Ruscanu и сарадници су испитали значај интрацелуларног процесовања оличеног у матурацији ендо/лизозомалних везикула и доказали да инхибитори ендолизозомалне матурације блокирају синтезу IFN I. Интерферонска каскада, код плазмоцитоподобних дендритичних ћелија, инфицираних са BTV, се покреће преко Myd88 адаптерског протеина и независна је од TLR7/8 активације (Ruscanu и сар., 2012). Примарна одговорност за препознавање BTV у плазмоцитоподобним дендритичним ћелијама још увек није јасно дефинисана, али постоје мишљења да би неке нове хеликазе у сарадњи са MyD88 могле бити укључене у процес препознавања двоструке вирусне РНК у цитоплазми (Ruscanu и сар., 2012).

Како други вируси тако и вирус катаралне грознице оваца има механизме којима неутралише интерферонски одговор домаћина. Утврђено је, до сада, да два протеина имају способност интеракције са интерферонским системом (Chauveau и сар., 2013; Doseul и сар., 2014; Ratiniер и сар., 2011). Испитивана је ефикасност експримираних продуката из различитих ORF на активацију IFN- β промотора на 293 Т ћелијама и утврђено да NS3 од свих BTV протеина најефикасније редукује активност IFN- β промотора (Chauveau и сар., 2013).

Протеин NS4 је BTV неструктурни протеин који интерагује са имунолошким системом домаћина. Овај протеин поседује један леуцински локус и сматра се да он може везати нуклеинске киселине и тиме контролисати транскрипцију гена одговорних за покретање интерферонске каскаде (Ratiniер и сар., 2011). Интерферонски систем усмерен против активности вируса не постоји код инеската, али постоје други механизми којима се ћелије инсеката супростављају вирусом. Давно је утврђено да КС ћелије могу бити перзистентно инфициране вирусом без испољавања цитопатогеног ефекта. У касној фази инфекције могу се уочити у цитоплазми ћелија куликоида велике појединачне

везикуле, вероватно настале спајањем мањих телашаца. Ћелије које садрже ове велике везикуле садрже врло мало вирусних партикула што говори да ћелије инсеката имају способност да инхибирају вирусну репликацију (Fu, 1999).

У ћелијама инсеката утврђено је присуство интерференцијске РНК, усмерене против осам сегмената вирусног генома, која је способна да инхибира вирусну репликацију (Schnettler и сар., 2013).

2.14. Еволуција вируса катаралне грознице оваца

Генетички дрифт, реасортирање и интрагенска рекомбинација су одговорни за еволуцију вируса катаралне грознице оваца (Batten и сар., 2008б; Vonneau и сар., 2001; Shaw и сар., 2013; Nomikou и сар., 2015). Анализом секвенци које кодирају VP2 и NS3 током наизменичних циклуса репликације у векторима и овцама односно теладима утврђено је да је генетички дрифт одговоран за еволуцију ових сегмената те да сегменти генома еволуирају независно један од другог па настаје хетерогена мутант популација и код преживара и код куликоида (Vonneau и сар., 2001). Такође, утврђено је постојање хомологих рекомбинација у више од 1,6% вирусног генома (He и сар., 2010). Реасортирање генома вируса катаралне грознице оваца се редовно јавља како на терену тако и у експерименталним условима, а резултира значајним променама у степену вируленције (Batten и сар., 2008b; Celma и сар., 2014; Coetzee и сар., 2014; Shaw и сар., 2013). Реасортиман између серотипова може обухватити појединачне односно мултипле сегменте дајући тако многобројне могуће варијанте (Shaw и сар., 2013). Генетски реасортиман је појава распрострањена у целом свету и сноси одговорност за генетску разноврсност европских сојева вируса катаралне грознице оваца. Показало се да су бар четири вакцинална јужноафричка соја била укључена у процесе реасортирања последњих година (Nomikou и сар., 2015) што је значајан податак пошто атенуација на културама ћелија може изазвати промене у афинитету према рецепторима и ткивном тропизму.

2.15. Превенција и терапија катаралне грознице оваца

Не постоји специфична терапија животиња оболелих од катаралне грознице оваца. Мора се пажљиво поступати са оболелим животињама, а може се укључити симптоматска терапија, најчешће у виду апликације нестероидних антиинфламаторних препарата (Radostis и сар., 1994; Tweedle и Mellor, 2002). Приоритетна мера у сузбијању је моментална забрана увоза животиња из земаља у којима има катаралне грознице оваца уз истовремени мониторинг на фармама за узгој преживара који укључује клиничку опсервацију, серолошко и вирусолошко тестирање и мониторинг инсеката који имају векторску улогу. Stamping out метод је до 1998. године био главна контролна мера у сузбијању катаралне грознице оваца. Такође, све сумњиве животиње у радиусу од 3 km од погођене области су упућиване на клање (Carogale и Giovannini, 2010). Профилактичка имунизација, елиминација вектора и спречавање контакта вектора и домаћина се такође могу применити.

Као главна мера у сузбијању катаралне грознице оваца у ендемским областима спроводи се вакцинација. Прву атенуирану вакцину изумио је Theiler коју је добио мултиплим пасажама инфективне крви оваца (Theiler, 1908). Главни аспекти вакциналне стратегије су: спречавање појаве клинички манифестне болести или бар ублажавање клиничке слике, спречавање регионалног ширења болести, омогућавање ерадикације болести у земљи или региону засноване на блокади циркулације вируса у природи и омогућавање трансфера пријемчивих животиња између заражених и слободних подручја (Savini и сар., 2008; Carogale и Giovannini, 2010). Вакцине против катаралне грознице оваца су серотип специфичне што треба узети у обзир приликом одабира вакцине у одређеном подручју (Bhanuprakash и сар., 2009). Две су врсте вакцина на располагању и то инактивиране и живе атенуиране. Живе атенуиране вакцине су биле до скоро једине расположиве комерцијалне вакцине на тржишту (Carogale и Giovannini, 2010) и њихова примена је почела у ендемским областима где су заступљени разни серотипови као нпр. у Јужноафричкој републици. У таквим областима поливалентне живе атенуиране вакцине против присутних серотипова се још увек

користе. Једна доза атенуиране вакцине је сасвим довољна да обезбеди добру заштиту против болести бар за годину дана, а уз то њихова производња није скупа (Savini и сар., 2008; Bhanuprakash и сар., 2009). Недостатак им је што могу изгубити своју ефикасност на температурама преко 35°C (Hammoumi и сар., 2003). Други недостатак је индукција прилично слабе заштите у случају инфекције са хетерологим серотиповима вируса (Tweedle и Mellor, 2002). Поред тога употреба атенуираних вакцина може довести до клиничких манифестација болести, абортуса, смањене производње млека и пада квалитета семена код овнова (Breard и сар., 2007; Savini и сар., 2008). Запажено је да вакцинација гравидних оваца узрокује настанак малформација на фетусима (Flanagan и Johnson, 1995; Tweedle и Mellor, 2002; Bhanuprakash и сар., 2009). Из тих разлога препоручује се спровођење вакцинације оваца девет до петнаест недеља пре парења, а овнова тек након парења (Bhanuprakash и сар., 2009). Атенуирани вакцинални вирус може проузроковати виремију која траје преко две недеље код вакцинисаних оваца (Veronesi и сар., 2005). Постоји могућност да вакцинални вирус инфицира векторе и поврати вируленцију или да, након реасортирања гена, у организму вакцинисаних животиња или вектора са изворним, дивљим вирусом настане нови вирус са новим особинама (Tweedle и Mellor, 2002; Veronesi и сар., 2005; Savini и сар., 2008). Атенуиране живе вакцине су такође коришћене у Италији, Француској, Бугарској, Португалији и Шпанији (Roy и сар., 2009). Због тератогених својстава, присуства на терену, могућег повратка вируленције многе су контроверзе због примене ових вакцина (Dungu и сар., 2004; Monaco и сар., 2004; Savini и сар., 2010). У многим случајевима имунизација атенуираним живим вакцинама је узроковала појаву клиничких симптома и виремију код вакцинисаних животиња (Savini и сар., 2010; Veronesi и сар., 2010). Вакцинални јужноафрички серотип BTV-16 је изазвао облољење код оваца у Европи (Savini и сар., 2010). Због тога је у Италији вакцина морала да се повуче из употребе с тенденцијом производње нове нешкодљиве атенуиране вакцине (Franchi и сар., 2008). Живе атенуиране вакцине су повучене из употребе у северној Европи и користе се инактивисане вакцине које се са успехом користе у медитеранским земљама од 2005. Показале су се безбедним, а индукују

квалитетну заштиту против хомологих сојева вируса (Eschbaumer и сар., 2009; Wackerlin и сар., 2010; Savini и сар., 2007; Savini и сар., 2008; Hamers и сар., 2009). Квалитетне инактивирани вакцине узрокују настанак квалитетног имуног одговора, али захтевају ревакцинацију (Savini и сар., 2008,2009). Иако је њихова производња у поређењу са живим вакцинама знатно скупља, оне у погледу безбедности и ефикасности имају примат (Schwartz-Cornil и сар., 2008; Bhanuprakash и сар., 2009). Инактивирани вакцине спречавају развој клиничке слике код пријемчивих домаћина, смањују економске губитке узроковане инфекцијом, омогућавају безбедан транспорт стоке, спречавају појаву виремије или је чине безначајном у случају инфекције хомологим серотипом вируса (Tweedle и Mellor, 2002; Bhanuprakash и сар., 2009). Након избијања епидемије катаралне грознице оваца у југоисточној Европи 1998 године по први пут је употребљена моноовалентна инактивисана вакцина прво против BTV-2, а потом и BTV-4 (Savini и сар., 2008). Последњих година развијају се разне рекомбинантне вакцине које се базирају на рекомбинантним вирусима са генима који енкодирају антигене вируса катаралне грознице оваца с циљем њихове експресије у организму домаћина након инокулације. Квалитет имунитета који се индукује у организму домаћина зависи од способности рекомбинантног вируса да испољи специфичне жељене гене у високом степену у ћелијама домаћина. Вирусни вектори који се користе у ове сврхе су атенуирани и суштински безбедни јер носе трансгене и лишени су молекуларних регулаторних елемената родитељског вируса па је стога и вероватноћа генског реасортимана са теренским вирусом високо редуцирана. Многи вируси (саргірох, vaccinia, herpes вируси) испитивани са аспекта ефикасности трансфера гена дали су различите резултате. Генерално узевши, векторске вакцине које експримирају VP2 су се показале најуспешнијим у успостављању заштитног имунолошког одговора (Calvo–Pinilla и сар., 2009b; Franchesì и сар., 2011; Ma и сар., 2012, Savini и сар., 2008). Рекомбинантне вакцине, на основу експерименталних испитивања, омогућавају репликацију вируса без ризика од реасортирања гена и експресије вируленције (Calvo–Pinilla и сар., 2009b; Boone и сар., 2007). Продукти нове генерације као што су честице налик вирусима (virus-like particles) са леталним мутацијама на VP6 гену и вируси инсуфицијентни у експресији NS3/NS3a

стимулишу имунолошки одговор домаћина дајући квалитетну серотип специфичну заштиту, не доводећи до детектабилне виремије код вакцинисаних животиња. Наиме, показало се да је NS3/NS3а дефицијентни вакцинални вирус авирулентан те да штити од потенцијалне инфекције. Антитела против NS3а се стварају након природне инфекције па ELISA тест заснован на детекцији ових антитела се користи као основа за DIVA тестирање. NS3/NS3а дефицијентни вакцинални вирус се репликује у организму, али само локално и даје виремију која се тешко може детектовати помоћу RT-PCR методе, те индукује сероконверзију и заштиту. Овако нарушена репликација вируса “in vivo” је вероватно последица одсуства NS3/NS3а који је неопходан за ослобађање вируса. Овакве вакцине много обећавају јер се репликују “in vivo” и вероватно не индукују виремију неопходну за трансмисију вируса преко вектора и називају се DISA (disabled infectious single-animal) вакцине против катаралне грознице оваца. Истовремена инфекција ћелија сисара или ћелија инсеката са DISA вакцином и вирусом са терена је неопходна за успешан процес реасортирања чија се реализација чини мало вероватном пошто се испоставило да DISA вакцина не циркулише кроз тело вакцинисаних животиња. Међутим, комерцијалне рекомбинантне вакцине у пракси, још увек, нису заживеле. (Stewart и сар., 2012; Stewart и сар., 2013; Celma и сар., 2013; Feenstra и сар., 2014; Feenstra и сар., 2015).

2.16. Контрола вектора

Јасно је да се вектори из рода *Culicoides* не могу у потпуности елиминисати из природног окружења, али је могуће редуковати њихову бројност, и онемогућити их да нападају пријемчиве животиње смештањем животиња у штале преко ноћи када се куликоиди хране. Могу се ставити застори у виду густе мреже импрегниране инсектицидом на врата и прозоре штале (Radostis и сар., 1994; Calvete и сар., 2010). Пријемчиве животиње треба склањати са места на којима се задржавају и размножавају куликоиди и по могућности таква места треба елиминисати. Познато је да се *C. imicola*, *C. pulicaris* и *C. obsoletus* размножавају у влажном земљишту богатом органским материјама те такве локалитете треба

дренирати и исушити. Контрола одраслих облика куликоида се може реализовати коришћењем дозвољених инсектицида (Schmahl и сар., 2009b) примењених око штала и у њима (на местима где се појављује *C.dewulfi*) па чак и директним третманом пријемчивих животиња. Третман животиња је дозвољен само ако се користе инсектициди ниске токсичности за сисаре као што су синтетички пиретроиди који обезбеђују заштиту у трајању од три до пет недеља (Mehlhorn и сар., 2009; Schmahl и сар., 2009b), а користе се у облику ушних маркица импрегнираних инсектицидом. Животиње се, такође, могу штитити и субкутаном или интракутаном администрацијом инвермектина. Могу се користити и репеленти са различитим степеном ефикасности (Tweedle и Mellor, 2002).

Мере које се примењују у контроли катаралне грознице оваца у Црној Гори су садржане у “Правилнику о мјерама за спрјечавање појаве, откривање, сузбијање и искорјењивање заразне болести плавог језика” а пренесене су из Директиве Савета 2000/75/EZ и Регулative Комисије 1266/2007. У случају појаве инфекције одређују се заражено и угрожено подручје на основу географских, административних, еколошких и епизоотиолошких фактора. Заражено подручје је област са полупречником најмање 100 км од газдинства на коме је утврђена инфекција, а угрожено подручје је у кругу полупречника од 50 км рачунајући од границе зараженог подручја. Мере које се предузимају су у складу са програмом праћења и надзора болести плавог језика, а обухватају: пасивни и активни надзор, ентомолошки надзор, рестриктивне мере по питању кретања животиња у и из зараженог и угроженог подручја, транспорта семена, јајних ћелија и ембриона животиња (Правилник о мјерама за спрјечавање појаве, откривање, сузбијање и искорјењивање заразне болести плавог језика, “Службени Лист ЦГ”, 3/2015).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Катарална грозница оваца или болест плавог језика је обољење преживара које је традиционално било везано за јужну земљину полулопту. Међутим, временом се болест „померала“ све северније тако да се на крају готово читав свет, пре или касније суочио, са болешћу. Циљ ове докторске дисертације је да допринесе бољем познавању болести кроз праћење литературе и праћење најновијих, савремених достигнућа везаних за дијагностику и карактеризацију узрочника катаралне грознице оваца и да буде извор значајних информација за целокупну ветеринарску службу Црне Горе, од чије благовремене и адекватне реакције зависи ефикасност у борби са катаралном грозницом оваца. Задатак ове докторске дисертације је да се:

- изврши серолошки мониторинг говеда и оваца на присуство антитела против катаралне грознице оваца,
- упореде добијени резултати о заступљености антитела код говеда и оваца,
- у случају позитивног серолошког налаза из крви real-time и конвенционалном PCR техником докажаже присуство вируса узрочника катаралне грознице оваца,
- одреди серотип вируса,
- изврши секвенцирање и филогенетска анализа изолата,
- утврди заступљеност и географска дистрибуција катаралне грознице оваца у Црној Гори,
- испита карактер макроскопских промена на органима уинулих оваца,
- одреди карактер патохистолошких промена на промењеним органима.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Мере које се примењују у контроли катаралне грознице оваца у Црној Гори су садржане у “Правилнику о мјерама за спрјечавање појаве, откривање, сузбијање и искорјењивање заразне болести плавог језика”, а пренесене су из Директиве Савета 2000/75/EZ и Регулативе Комисије 1266/2007. Мере које се предузимају су у складу са програмом праћења и надзора болести плавог језика, а обухватају: пасивни и активни надзор здравственог стања животиња на газдинствима, ентомолошки надзор, рестриктивне мере по питању кретања животиња у и из зараженог и угроженог подручја, транспорта семена, јајних ћелија и ембриона животиња (Правилник о мјерама за спрјечавање појаве, откривање, сузбијање и искорјењивање заразне болести плавог језика, “Службени Лист ЦГ”, 3/2015).

Материјал за серолошка и молекуларна испитивања је био подељен у две групе:

I- Прва група (активни надзор над катаралном грозницом говеда, оваца и коза узорковањем крвних серума од свих животиња из здравих запата)

II- Друга група (пасивни надзор над катаралном грозницом говеда, оваца и коза узорковањем крвних серума од животиња са испољеном клиничком сликом која одговара катаралној грозници оваца)

Првом групом обухваћени су узорци крвних серума оваца у оквиру активног надзора здравственог стања оваца у оквиру програма “Правилник о мјерама за спрјечавање појаве, откривање, сузбијање и искорјењивање заразне болести плавог језика”. Узорци су сакупљани с тежњом што равномерније заступљености свих регија у Црној Гори узимајући у обзир и званичне податке о бројном стању оваца и њиховој територијалној прерасподели. На овај начин је са подручја шеснаест општина у Црној Гори сакупљено и серолошки прегледано, на присуство специфичних антитела против вируса узрочника катаралне грознице оваца, укупно 944 узорка крвних серума оваца. Према анамнестичким подацима, овце од којих је узимана крв потицале су из здравих стада и држане су у амбијенталним условима

са задовољавајућом зоохигијеном. Крвни серуми оваца су испитивани у Специјалистичкој ветеринарској лабораторији у Подгорици.

Првом групом су, такође, обухваћени и узорци крвних серума говеда. Но, основу података о старости говеда из базе података Ветеринарског информационог система Ветеринарске управе Црне Горе, серолошки на присуство специфичних антитела против вируса узрочника катаралне грознице оваца, је прегледано укупно 953 узорка крвних серума говеда млађих од две године, како би се добио увид у постојање скорије инфекције. Узорци су сакупљени са подручја седамнаест општина при чему се, на основу званичних података о бројном стању говеда и њиховој територијалној прерасподели, водило рачуна о равномерној заступљености узорака крвних серума говеда са целе територије Црне Горе. Према анамнестичким подацима, говеда од којих је узимана крв потицала су из здравих стада. Крвни серуми говеда су испитивани у Специјалистичкој ветеринарској лабораторији у Подгорици.

Другом групом обухваћени су узорци крвних серума говеда, оваца и коза за које се, на основу клиничких симптома, основано сумњало да су оболеле од катаралне грознице оваца. Од откривања првог случаја катаралне грознице оваца код једне краве са територије општине Даниловград, село Косић, дана 06. октобра 2014. године, прегледан је велики број узорака пореклом од клинички суспектних животиња и то: 114 узорака пореклом од говеда, 302 узорка пореклом од оваца и 22 узорка пореклом од коза.

4.1. Патоморфолошке и патохистолошке методе

Материјал за патоморфолошка и патохистолошка испитивања су чиниле овце друге групе, код којих је постојала сумња на катаралну грозницу. Серолошки негативне на вирус катаралне грознице и здраве након клиничког прегледа, овце су послате у индустријске кланице на територији града Подгорице. На линији клања су прегледани сви органи заканих оваца, методом адспекције.

Угинуле овце су за живота испољавале клиничке симптоме болести, серолошки су биле позитивне и молекуларним анализама је доказано присуство секвенце вирусне РНК. Обдукција је вршена у обдукционој сали Специјалистичке

ветеринарске лабораторије у Подгорици. Током обдукције сликане су све изражене промене код угинулих оваца. Након завршене обдукције од сваке овце су издвојени промењени органи од којих су узета ткива за патохистолошка испитивања. Исечци ткива (1 x 1 x 0,5 cm) су потопљени у 10% неутрални пуферизовани формалин у коме су држани 48 сати при чему је однос формалина и ткива био 10:1. Раствор формалина је направљен на следећи начин:

Концентровани раствор формалина (37-40%) је најпре неутрализован додавањем 5% раствора натријум карбоната (Na_2CO_3) чиме је рН подешен на 7,2. Тако је добијен 10% неутрални формалин, који је у следећем кораку пуферизован додавањем монобазног односно дибазног натријум фосфата (NaH_2PO_4 односно Na_2HPO_4). Соли су најпре растворене у дестилованој води, а онда је додат 37-40% неутрални концентровани формалин.

Рецептура за пуферизацију формалина:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	40 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	99 gr
Дестилована вода	9000 ml
37-40% неутрални концентровани формалин	1000 ml

Након фиксације ткива су у аутоматском ткивном процесору (Microm – STP 120) доведена до парафина (Bioplast, тачка топљења 56-58°C) по следећој процедури, која је дата у табели 3.

Табела 3. Процедура фиксације узорака ткива

70% етанол	1,5 h
96% етанол	1,5 h
96% етанол	1,5 h
100% етанол	1,5 h
100% етанол	2 h
100% етанол	2,5 h
Ксилол	1,5 h
Ксилол	1,5 h

Ксилол	2 h
Парафин	2 h
Парафин	2,5 h

Из аутоматског ткивног процесора ткива су укалупљена у парафин помоћу система за уклапање у парафин (Leica EG 1150 H). Након тога, парафински блокови су резани на микротому у танке листиће дебљине 5 μ m, који су потом фиксирани на микроскопске плочице применом депарафинизације (табела 4) и бојени хематоксилин-еозин методом (табела 5).

Табела 4. Процедура депарафинизације исечака

Ксилол	5 min
Ксилол	5 min
100% етанол	3 min
96% етанол	3 min
70% етанол	3 min
Дестилована вода	3 min

Табела 5. Процес бојења хистолошких препарата хематоксилин-еозином

Хематоксилин (Gill III)	3 min
Текућа вода	5 min
Кисели алкохол*	30 sec
Текућа вода	2 min
Дестилована вода	2 min
Еозин (Eosin Y 0,5% aqueous)	3 min
Текућа вода	30 sec

* 1 ml концентроване HCl +400 ml 70% етанола

Након бојења и делимичног сушења на обојене исечке је нанесена синтетичка смола, а потом и покровно стакалце. Препарати су посматрани под

електричним микроскопом (OLYMPUS BX 53) са инсталираним софтвером (Olympus softver CellSens).

4.2. Серолошка и молекуларна испитивања

Материјал за серолошка и молекуларна испитивања оваца, говеда и коза прве и друге групе, је узоркован у стерилним вакутејнерима који су по приспећу у лабораторију центрифуговани 10 минута на 1500 обртаја/мин како би се добио што чистији крвни серум. Након тога, серуми су преливани у микротитрационе плоче и тестирани су серолошки cELISA testom (*IDEXX Bluetongue Virus (BTV) VP7 Antibody Test Kit*). Наведени кит је подесан за детекцију специфичних антитела у узорцима крвног серума и плазме пореклом од говеда, оваца и коза. Микротитрационе плоче су превучене са рекомбинантним протеином VP7. Испитивани серуми су најпре разређени и дистрибуирани у базене микротитар плоче и након тога инкубирани. Током инкубације VP7 специфична антитела из испитиваног серума, уколико су присутна, формирају имуне комплексе са VP7. Након тога је додаван коњугат који представља анти VP7 антитело везано са ензимом. У присуству комплекса антиген антитело коњугат се не може везати за одговарајуће епитопе на површини микротитар плоче. Насупрот томе, уколико у испитиваном серуму нема антитела против VP7 коњугат се несметано везује за своје одговарајуће епитопе са површине базена микротитар плоче. Невезани коњугат се испере и након тога се дода супстрат ензима ТМБ. У присуству ензима супстрат се оксидује што се очитује појавом плаве боје која прелази у жуту након додавања стоп раствора. Интензитет развијене боје је обрнуто пропорционалан количини анти-VP7 антитела у испитиваном серуму. Процена резултата је на крају вршена поређењем оптичке густине узорка са средњом вредности оптичке густине негативне контроле. Целокупна процедура је спроведена у складу са упутством произвођача након што су реагенси из дијагностичког кита пре саме процедуре држани на собној температури (18-26°C) у трајању од два сата. Сви реагенси су пре употребе

хомогенизовани помоћу вортекса. Детаљна процедура се састојала из следећих корака:

- Најпре су сви концентровани реагенси, а који нису за директну употребу, разређени.

- Концентровани раствор за испирање (20x) је пре употребе разређен са дејонизованом водом у односу 1:20 и као такав може се користити и до три дана ако се чува на температури од 2-8°C.

- Концентровани коњугат је разређен са раствором за испирање, такође у односу 1:20. Овако припремљени раствор коњугата је стабилан до осам часова на температури од 18-26°C.

- У одговарајућа удубљења микротитрационе плоче нанесено је по 80 µl пуфера за разређивање (Dilution buffer) .

- По 20 µl позитивне и негативне контроле као и испитујућих серума додато је у одговарајућа удубљења микротитрационе плоче.

- Садржај микротитрационе плоче је промешан на шејкеру и плоча је покривена.

- Плоча је инкубирана на температури 18-26°C током 45 minuta (±3min).

- Потом је додато по 100 µl претходно разређеног коњугата у свако удубљење.

- Садржај микротитрационе плоче је пажљиво и брзо промешан тапкањем руба плоче и покривен.

- Плоча је инкубирана на температури 18-26°C током 45 minuta (±3min).

- Свако удубљење микротитрационе плоче је потом испрано са 300 µl раније припремљеног раствора за испирање три пут. Након испирања, преостали садржај микротитрационе плоче је одстрањен колико је то могуће снажним тапкањем на дебљи слој папирне вате. Плоча не сме да остане дуго сува већ се одмах наставља са извођењем наредних корака теста.

- У свако удубљење додато је по 100 µl ТМВ супстрата.

- Плоча је заштићена од дејства директне светлости и инкубирана на температури од 18-26°C током 10 минута.

- Реакција је заустављена додавањем по 100 μ l стоп раствора у свако удубљење. Стоп раствор је додаван истим редоследом и брзином као супстрат.

- Резултати су читавани одмах на ELISA читачу (фотометар) на таласној дужини од 450 nm.

Ради валидације резултата, обавезно се проверава вредност оптичке густине (OD) негативне контроле која мора бити > 0.700 , и < 3.000 , а S/N проценат позитивне контроле мора бити мањи од 20%.

Процена сваког појединачног узорка се врши на основу односа између OD узорка и OD негативне контроле на следећи начин:

$$S/N\% = (OD_{uzor} / OD_{neg}) \times 100$$

Испитивани узорак серума је позитиван уколико има $S/N\% \geq 80\%$.

Испитивани узорак серума је позитиван уколико има $S/N\% = 70\% - 80\%$.

Испитивани узорак серума је позитиван уколико има $S/N\% \leq 70\%$.

У случајевима када су откривене серопозитивне јединке вршило се поновно узорковање крви од серопозитивних животиња и то истовременим узимањем два узорка од којих је један за поновљено серолошко испитивање, а други у EDTA епрувети за испитивање молекуларном техником Real-Time RT-PCR у циљу детекције евентуалног присуства секвенце РНК вируса узрочника катаралне грознице оваца. На тај начин је посебно издвојен материјал за молекуларна испитивања. Молекуларна испитивања методом Real-Time RT-PCR спроведена су са китовима QIAamp RNA Mini Viral Kit за екстракцију РНК и Quantitect Probe RNA Kit за амплификацију, оба произвођача Qiagen. Денатурација двоструког ланца РНК вршена је у конвенционалном термосајклеру, Techne TC-PLUS, а затим полеђивање у течном азоту.

За ланчану реакцију полимеразе је коришћен Pan-BTV rRT-PCR протокол заснован на публикацији Toussiant и сар., (2007). Протокол се заснива на амплификацији фрагмента од 76 bp сегмента 5(NS1) вируса катаралне грознице оваца. Коришћени кит садржи реверзну транскриптазу и ТАQ полимеразу што омогућава извођење и реверзне транскрипције и ланчане реакције полимеразе у једном кораку. Праћење реакције је омогућено коришћењем флуоресцентно обележене пробе (TaqMan probe).

У случају позитивних резултата спроведена је и конвенционална PCR метода, употребом One step PCR кита, уз коришћење два пара прајмера за серотип ВТВ-4.

4.2.1. Екстракција РНК

Екстракција РНК помоћу QIAamp RNA Mini Viral kit-а подразумева да се узорак најпре лизира, при чему се инактивишу РН-азе и омогућава се изолација интактне вирусне РНК. Затим се подешава пуферска средина која омогућава оптимално везивање РНК за силикатну мембрану и узорак се наноси у колоне које садрже силикатну мембрану. РНК се везује за мембрану, а контаминенти се ефикасно одстрањују двократним испирањем са два различита пуфера. На крају се РНК спира са силикатне мембране коришћењем пуфера слободног од РНазе, а екстрахована РНК може одмах да се користи или да се складишти. Екстрахована РНК је слободна од протеина, нуклеаза, других контаминената и инхибитора. Затим се у мини бочицу са лиофилизованом носачем (Carrier RNA) додаје 310 μ Buffer-а AVE при чему се води рачуна да је лиофилизат добро растворен у пуферу. Припремљена Carrier RNA је аликвотирана и стављена на -20°C. Пре мешања Buffer-а AVE са Carrier RNA мора се погледати да ли у њему има талоба, па уколико има ставити га кратко на инкубацију на 80°C, како би се талог растворио. Затим се у пластичну већу епрувету сипа AVL, дода унапред припремљена Carrier RNA према подацим из табеле 5.

Табела 5. Екстракција РНК помоћу QIAamp RNA Mini Viral kit-а

Број узорака:	AVL (ml)	Carrier RNA (μ l)	Број узорака:	AVL (ml)	Carrier RNA (μ l)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,64	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,60	56	22	12,32	123,2

11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

Кад год је био већи број узорака за екстракцију (изнад 8), приликом припремања микса рачуна се као да има један узорак више.

Након додавања AVL и Carrier RNA, епрувету благо мешамо okreћући горе доле у трајању до 10 минута.

Стерилне микротубе су припремљене, обележене и стављене у сталак.

Процедура рада:

1. У микротубе је уливено 560 µl Buffera AVL, коме је претходно додат Carrier RNA.
2. Томе је додато 140µl узорка, а потом је добро измешано на вортексу у трајању од 15 секунди.
3. Инкубација је трајала 10 минута на собној температури.
4. Сprovedено је кратко центрифугирање да се спусте капљице са поклопца.
5. У микротубе је додато 560µl 100% етанола, вортексовано је 15 секунди, а затим кратко центрифугирано да се спусте капљице.
6. Припремљене су (извађене и обележене) QIAamp мини колоне са филтером и постављене у 2 ml микротубе и у њих је уливено 630µl течности претходно припремљеног микса. Затворен је поклопац филтера и центрифугирано је 1 минут на 8000rpm. Након вађења из центрифуге у нове чисте микротубе од 2 ml је пребачен филтер, а тубе са филтратом су елиминисане.
7. Отворени су поклопци филтера и поновљен је корак бр.6
8. Пажљиво су отворени филтери и додато је 500µl Buffer-a AW1, затворени су поклопци, центрифугирано 1 минут на 8000rpm. Након вађења из центрифуге у нове, чисте тубе од 2ml (из кита) пребачени су филтери, а тубе са филтратом су елиминисане.
9. Пажљиво су отворени филтери и додато је 500µ Buffer-a AW2, затворен је поклопац, центрифугирано 3 минута на 14000 rpm.
10. У припремљене (извађене и обележене) микротубе од 1.5 ml стављени су одговарајући филтери после центрифугирања (исфилтрирани део са тубом је елиминисан). Пажљиво је отворен поклопац филтера и апликовано је 60µl Buffer-a

AVE. Остављено је 1 минут на собној температури, а затим центрифугирано 1 минут на 8000rpm. Потом су извађене микротубе, елиминисани филтери, а добро затворене микротубе и екстрахована РНК стављена у замрзивач на -80°C.

Целокупан процес екстракције је обављен у ламинарној комори која је по завршетку рада затворена са укљученом UV лампом у трајању од 20 минута. После тога, комора је отворена и очишћена.

4.2.2. Real-time RT-PCR

Општи аспекти су:

- а) Амплификација заснивана на QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen), са тоталном запремином реакционе смеше од 25 µl.
- б) Контроле: NTC (негативна контрола), најмање једна PC (позитивна контрола – BTV4) и IC (IC2-RNA).

Табела 6. Припрема прајмер микса за детекцију BTV-S5

Волумен	Олигонуклеотид (Концентрација)	Секвенца 5' - 3'	Локација на матрици у сегменту 5
30,0 µl	BTV-S5-F_1-19 (100 pmol/ µl)	GGC AAC YAC CAA ACA TGG A	21-39
30,0 µl	BTV-S5-R_76-57 (100 pmol/ µl)	AAA GTY CTC GTG GCA TTW GC	77-96
2,5 µl	BTV-S5-FAM (100 pmol/ µl)	FAM- CYC CAc TGa TRT TgT AtT tTc TCA A- TAMRA	49-69
137,5 µl	10,1xTE(pH=8,0) вода слободна од РНА -за		
200 µl	Pan-BTV-S5-Mix-FAM Primer-probe mix		

Табела 7. Припрема EGFP микса

Волумен	Олигонуклеотид (Концентрација)	Секвенца 5' - 3'	Локација на матрици у актин и РНК
5,0 μ l	5 μ EGFP-11-F (100 pmol/ μ l)	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G	1005-1029
5,0 μ l	EGFP-10-r (100 pmol/ μ l)	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	1114-1135
2,5 μ l	EGFP-1HEX (100 pmol/ μ l)	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	1081-1105
187,5 μ l	10,1xTE(pH=8,0) вода слободна од РНА -за		
200 μ l	EGFP-Mix4(5) Primer-probe mix		

(Hoffmann et al. 2006)

Количина мастер микса зависи од броја екстрахованих узорака и броја контрола (позитивних и негативних). Начин припреме мастер микса је дат у табели 8. После припреме, мастер микс се ставља у замрзивач до момента употребе.

Табела 8. Припрема мастер микса

Пипетирање (кораца)	Мастер микс компоненте:	Запремина:
1.	Rnase free water	3,0 μ l
2.	2xQuantitect RT-PCR master mix	12,5 μ l

3.	Reverse transcriptase mix (RT-mix)	0,25µl
4.	IC2-RNA (2x10 ⁵ copies/µ)	0,25µl
5.	Primer-probe mix 1: EGFP-Mix4 (5)	2µl
6.	Primer-probe mix 2: Pan-BTV-S5-Mix	2µl
	Total volume master mix	20µl
	Total volume per well	25µl

Пре стављања у PCR машину (AB 7500), а у циљу омогућавања репликације нуклеинске киселине, спроведена је денатурација двоструког ланца РНК загревањем на 95 °C, а потом хлађењем течним азотом.

Поступак:

1. Стављено је 5 по µl екстраховане РНК у 0,2 ml бунарчиће PCR плоче.
2. Запечаћена је PCR плоча помоћу адекватних PCR затварача (ABSOLUTE QPCR Seal, #AB-1170; Abgene).
3. Извршена је денатурација топлотом на 95°C, 2 минута употребом термосајклера.
4. PCR плоча је одмах пребачена у посуду са течним азотом.
5. После 20 секунди хлађења извађена је PCR плоча.
6. Уклоњени су PCR поклопци.

Након денатурације двоструког ланца РНК додати 20 µl унапред припремљеног мастер микса. Поново запечатити са одговарајућим поклопцем и центрифуговати кратко (7 секунди).

Температурни режим:

Реверзна транскрипција	50°C	30min	
Инактивација RT/Активација Taq	95°C	15min	
Денатурација	95°C	} 42 циклуса	30sec
Спајање са матрицом	56°C		30sec
Елонгација	72°C		30sec

#Подаци флуоресценције се приказују у Annealing фази.

Интензитет флуоресценције је мерен на оптичком систему АВ 7500 на крају сваке анилинг фазе.

Конвенционална PCR метода, (ланчана реакција полимеразе) уз употребу One step PCR кита и коришћење два пара прајмера за серотип BTV-4.

Прајмери:

BTV4-194F AGCGCGCTTAACTATAAACCAAC
 BTV4-840R ATCCGAGTTCTATCATATGACGC

BTV4-281F AAGTCGGTTAAGAACGCACGC
 BTV4-782R ТААТҮТСҮССҮСТТАТТАТАТСТGG

За сваки позитиван узорак је припреман четвороструки мастер микс по следећој шеми датој у табели 9.

Табела 9. BTV4 прајмер микс

Mix-1	Mix-2	Mix-3	Mix-4	pmol/ μ L	Волумен
BTV4-281F	BTV4-281F	BTV4-194F	BTV4-194F	100	10
BTV4-782R	BTV4-840R	BTV4-782R	BTV4-840R	100	10
502 bp	560 bp	589 bp	647 bp	H ₂ O	80

Табела 10. Припрема мастер микса

Компонента	Конц.	1 (μ L)	20
DEPC_H ₂ O		11,50	230,00
5x Qiagen 1 step RT-PCR buffer	1x	5,00	100,00
Qiagen dNTP mix		1,00	20,00
Primer mix (10 pmol/ μ L)	0.6 pM/ μ L	1,50	30,00
Qiagen 1 step RT-PCR enzyme mix		1,00	20,00

УКУПНО: 0,00 20,00
 25 25,00 5,00

После припреме, мастер микс се додаје у претходно денатурисану РНК (5µl) (по горе описаном протоколу у 0,2 ml микротубице), а затим у термосајклер Techne TC-Plus по следећем температурном протоколу датом у табели 11.

Табела 11. Температурни протокол

50 ⁰ C - 30 min.	x40
95 ⁰ C - 15 min.	
94 ⁰ C - 40 s.	
55 ⁰ C - 40 s.	
72 ⁰ C - 1 min.	
72 ⁰ C - 10 min	

Визуелизација је вршена на агарозном гелу, коришћењем Syber Safe и система за визуелизацију.

За електрофорезу су коришћени следећи реагенси:

- 10x TAE, Gibco
- Syber Safe
- Агароза гел (1% за ланчану реакцију полимеразе)
- Loading blue dye - Blue Juice, Invitrogen
- DNA Ladder, 100bp, Invitrogen

Припрема агароза гела је урађена по следећем реду:

- 1,5gr агарозе и 150ml 1X TAE су одмерени у ерленмајерици и промешани, а затим загрејани до кључања.
- Након што се течност охладила на шездесетак степени додато је 15µl Syber safe, а затим благо промешано кружним покретима
- Раствор је усут у посуду за електрофорезу са чешљевима
- Када је гел полимеризован, чешљеви су извађени, а уливен је 1xTAE да прекрије гел.
- У прву рупу је апликовано 3 µl DNA Ladder, 100bp
- 10 µl PCR производа је помешано са 2 µl Blue Juice

- Посуда је прекривена и доведен је напон од 100V током 70 минута.
- Резултати су читавани коришћењем система за визуелизацију Euro-Lone
- Гел је посматран под UV светлошћу трансилуминатора.

Након завршене и очитане електрофорезе, приступило се сечењу добијених бендова скалпером. Бендови су стављени у микротубе од 1,5 ml, након чега се приступило њиховој пурификацији. За пурификацију је коришћен кит за екстракцију из гела по следећем протоколу:

- Измерена је маса гела, па затим додат трострука запремина Buffera QG
- Спроведена је инкубација на 50°C 10 минута уз повремено вортексовање
- Након комплетног растварања проверена је боја раствореног гела (жута)
- У микротубу је додата иста запремина изопропанола
- Све је преапликовано у QIAquick колоне, а потом све центрифугирано 1 минут на 10000rpm
- Одбачен је филтрат, а QIA quick колона потом враћена у исту тубицу
- Додато је 0,5ml Buffera QG, а потом центрифугирано у центрифуги 1 минут на 10000rpm
- За испирање је додато 0,75 ml Buffera PE у QIAquick колону потом центрифугирано 1 минут на 10000rpm
- Одбачен је филтрат, а затим враћена QIAquick колона у исту тубицу и центрифугирано на 13000 rpm додатно 1 минут.
- QIAquick колона је пребачена у чисту 1,5ml микротубу
- Додато је 50µl Buffera EB у центар QIAquick мембране и центрифугирано 1 минут на максималној брзини.

За коначну потврду резултата PCR ампликони BTV-4 су секвенцирани у оба смера (SEQme, <https://www.seqme.eu/en/>) употребом специфичних прајмера. Добијене форвардне и реверзне фрагмент секвенце (seg-2 цела ужина 2926) су обрађене коришћењем SeqManII v5.05 program (DNASTAR Inc., Madison, Wi, USA). Добијене секвенце су поређене са секвенцама из референтне базе података Института у Пирбрајту, где је и одрађено секвенцирање, те је на основу филогенетске анализе конструисано филогенетско стабло.

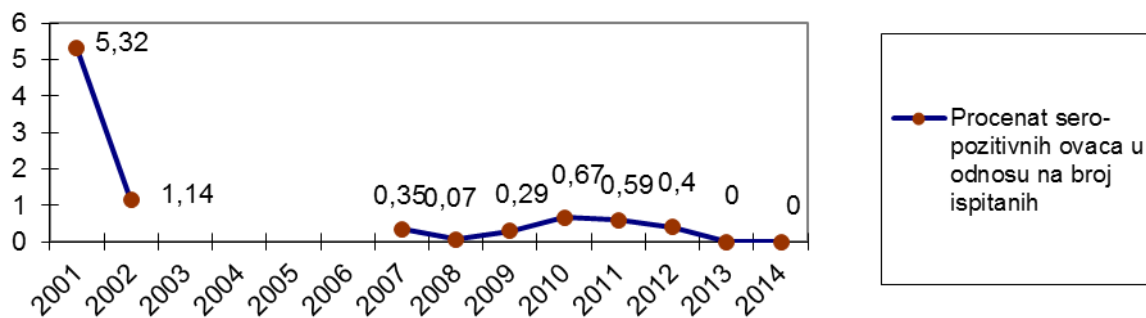
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

5.1. Серолошки и молекуларни налаз прве групе

Примарним-скрининг серолошким испитивањем 944 крвна серума оваца (активни надзор) које је спроведено у периоду август-новембар 2014. године са подручја 16 општина у Црној Гори, није утврђено присуство специфичних антитела против вируса, узročника катаралне грознице (табела 12).

Табела 12. Приказ броја испитаних узорака крвних серума оваца по општинама

Општина	Ветеринарска амбуланта	Број испитаних узорака по ВА	Укупно испитано у општини
Подгорица	Подгорица д.о.о.	59	59
Цетиње	ВетМедица	59	59
Улцињ	Ветеринариа	59	59
Никшић	Никшић д.о.о.	59	59
Бијело Поље	Бијело Поље д.о.о.	59	59
Беране	Беране д.о.о.	59	59
Пљевља	ФармаВет, Савић	59	59
Рожаје	Рожаје д.о.о.	59	59
Андријевица		0	0
Мојковац	Васо Ђуровић	59	59
Даниловград	ПримаВет	59	59
Колашин	Колашин д.о.о.	59	59
Плав	Плав д.о.о.	59	59
Плужине	Др Каранфиловски	59	59
Жабљак	Жабљак д.о.о.	59	59
Бар	Бар д.о.о.	59	59
Шавник	Сињајевина д.о.о.	59	59
УКУПНО ИСПИТАНО УЗОРАКА У ЦГ:			944



Графикон 1. Процент серопозитивних оваца у периоду 2001-2014.

Из приложеног графикана 1, се види да у оквиру активног надзора међу испитаним овцама нису нађене серопозитивне јединке током 2014. године. Тако је било и 2013. године, док у периоду од 2007. до 2012. године проценат серопозитивности није прелазио 0,67%.

Примарним-скрининг серолошким испитивањем 953 крвна серума говеда (активни надзор) које је спроведено у периоду август-октобар 2014. године (табела 13), утврђено је присуство специфичних антитела против вируса узročника катаралне грознице у укупно 53 узорка, док у осталих 900 испитаних узорка није утврђено присуство специфичних антитела (табела 14).

Табела 13. Приказ броја испитаних узорка крви говеда по општинама

Општина	Ветеринарска амбуланта	Број испитаних узорка по ВА	Укупно испитано у општини
Подгорица	АнимаВет	55	59
	МонтВет	4	
Цетиње	ВетМедица	31	31
Улцињ	Ветеринариа	53	58
	Ветеринум	5	
Никшић	Никшић д.о.о.	59	59
Бијело Поље	Бијело Поље д.о.о.	26	59
	Вет - Санус	13	
	Грандов	20	
Беране	Беране д.о.о.	54	59
	Ралевић	5	
Пљевља	Савић	41	59
	Др Каранфиловски	18	
Рожаје	Рожаје д.о.о.	59	59

Андријевица	Беране д.о.о. Андријевица	-	58	58
Мојковац	Васо Ђуровић		58	58
Даниловград	ПримаВет		58	58
Колашин	Колашин д.о.о.		58	58
Плав	Плав д.о.о.		58	58
Плужине	Др Каранфиловски		58	58
Жабљак	Жабљак д.о.о.		58	58
Бар	Бар д.о.о.		58	58
Шавник	Сињајевина д.о.о.		46	46
УКУПНО ИСПИТАНО УЗОРАКА У ЦГ:				953

Од свих крвних серума говеда која су током примарног-скрининг испитивања била серопозитивна (53), поновним испитивањем након поновног узорковања серолошки и молекуларном методом real-time RT-PCR је испитано 24 узорка. Резултати тих испитивања дати су у табели 14.

Табела 14. Преглед серо-позитивних узорака крви говеда током примарног (скрининг) испитивања и резултата поновљеног потврдног испитивања

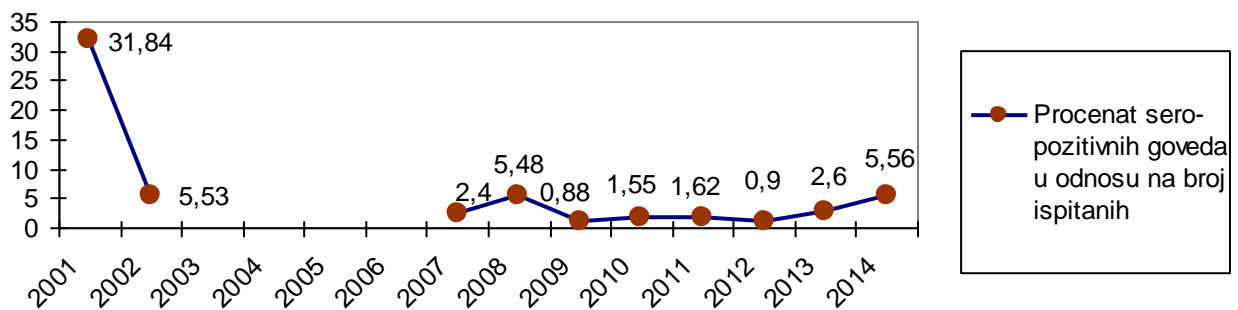
ПРИМАРНО ИСПИТИВАЊЕ (СКРИНИНГ)							ПОНОВЉЕНО ИСПИТИВАЊЕ		
Р. бр.	Ознака узорка	Упут број	Лаб. Бр.	Пошиљалац (ветеринаска амбуланта)	Општина	Ушна маркица	Лаб. број	Серо	Секвен. РНК вируса ВТВ (Real-Time PCR)
1.	78501113	1000003692	2479	Плав д.о.о.	Плав	12373178	2989	НЕГ	НЕГ
2.	78772016	1000003768	2653	ВА Савић	Пљевља	12579297	2777	НЕГ	НЕГ
3.	78683987	1000003782	2755	ВА Андријевица	Андријевица	11277989	3455	НЕГ	НЕГ
4.	78688672	1000003782	2755	ВА Андријевица	Андријевица	11277996	3455	НЕГ	НЕГ
5.	78677401	1000003782	2755	ВА Андријевица	Андријевица	11865261	3455	НЕГ	НЕГ
6.	78686791	1000003782	2755	ВАндријевица	Андријевица	11277965	3455	НЕГ	НЕГ
7.	77506614	1000003795	2743	ПримаВет	Даниловград	12979325	2952	ПОЗ	ПОЗ
8.	78049981	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989447	3786	ПОЗ	ПОЗ
9.	78427852	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	11200953	3786	НЕГ	НЕГ
10.	78551041	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12982516	3786	ПОЗ	ПОЗ
11.	78425983	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	11200703	3786	ПОЗ	НЕГ
12.	78426803	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	11200949	3786	ПОЗ	ПОЗ
13.	78430664	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12982684	3786	ПОЗ	ПОЗ

14.	78050206	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989324	3786	НЕГ	НЕГ
15.	78425996	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	11200666	3786	НЕГ	НЕГ
16.	78429675	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	11200963	3786	ПОЗ	ПОЗ
17.	78425912	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989133	3786	ПОЗ	ПОЗ
18.	78430606	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989102	3786	НЕГ	НЕГ
19.	78070712	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989393	3786	НЕГ	НЕГ
20.	78425925	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989041	3786	НЕГ	НЕГ
21.	78429691	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989140	3786	НЕГ	НЕГ
22.	78430622	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989072	3786	НЕГ	НЕГ
23.	78077065	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12989348	3786	ПОЗ	ПОЗ
24.	78656682	1000003834	2797	Бар д.о.о.	Бар	12982677	3786	ПОЗ	ПОЗ
25.	79070089	1000004038	3339	Ветеринум	Улцињ	12752553		Није достављено	
26.	79062594	1000004038	3339	Ветеринум	Улцињ	12752898		Није достављено	
27.	79062622	1000004038	3339	Ветеринум	Улцињ	12748242		Није достављено	
28.	78949160	1000004052	3354	Ветеринариа	Улцињ	12636709		Није достављено	
29.	78951318	1000004052	3354	Ветеринариа	Улцињ	12981083		Није достављено	
30.	78955790	1000004052	3354	Ветеринариа	Улцињ	12393619		Није достављено	
31.	78954825	1000004052	3354	Ветеринариа	Улцињ	12981229		Није достављено	
32.	78951305	1000004052	3354	Ветеринариа	Улцињ	12981106		Није достављено	
33.	78953439	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12639052		Није достављено	
34.	78958111	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12985999		Није достављено	
35.	78957217	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12636686		Није достављено	
36.	78955279	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12639045		Није достављено	
37.	78953455	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12639038		Није достављено	
38.	78949735	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12982011		Није достављено	
39.	78951587	1000004070	3389	Ветеринариа	Улцињ	12217700		Није достављено	
40.	79193881	1000004100	3558	Ветеринариа	Улцињ	12639236		Није достављено	
41.	79197713	1000004100	3558	Ветеринариа	Улцињ	12639243		Није достављено	
42.	79196781	1000004100	3558	Ветеринариа	Улцињ	12639281		Није достављено	
43.	78953835	1000004100	3558	Ветеринариа	Улцињ	12639274		Није достављено	
44.	79193906	1000004100	3558	Ветеринариа	Улцињ	12639229		Није достављено	
45.	78951462	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639083		Није достављено	
46.	79197052	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639267		Није достављено	
47.	79197982	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639144		Није достављено	
48.	78950597	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12981069		Није достављено	
49.	78953442	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639120		Није достављено	
50.	78949582	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639151		Није достављено	
51.	78950175	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639304		Није достављено	
52.	78953343	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639090		Није достављено	
53.	78957994	1000004092	3557	Ветеринариа	Улцињ	12639137		Није достављено	

Резултати молекуларних испитивања методом real-time RT- PCR, која су спроведена код дијела говеда код којих је током примарних – скрининг испитивања утврђено присуство специфичних антитијела на вирус катаралне грознице (укупно 24 узорка), показала су да је код 9 говеда (табела 14) детектована секвенца РНК вируса катаралне грознице, док у 15 поново достављених узорака није детектована секвенца РНК вируса што значи да та говеда нису носиоци вируса.

Серолошка испитивања говеда и оваца на катаралну грозницу у Црној Гори која су спроведена у периоду од 2007-2014. године показала су већи број серопозитивних говеда у односу на број серопозитивних оваца. Међутим, током свих претходних година, након 2001. године, изражене су биле следеће карактеристике: одсуство морбидитета и морталитета. Веома ријетко су пријављени испољени клинички симптоми болести (и то само током 2001. године) што је указивало на слабу вирулентност евентуално присутног узрочника која најчешће доводи до латентног облика обољења препознатљивог само након лабораторијских испитивања.

Резултати примарних (скрининг) серолошких испитивања говеда и оваца током 2014. године, показали су само присуство извесног броја серопозитивних говеда (укупно 53), док није утврђено присуство серопозитивних оваца. Процент серопозитивних говеда у односу на број испитаних износи 5,56% и повећан је у односу на резултате сличних серолошких испитивања из претходних година (Графикон 2.)



Графикон 2. проценат серопозитивних говеда у периоду 2001-2014.

Имајући у виду да је овим катарална грозница први пут откривена након 13 година у Црној Гори, извршена су додатна потврдна дијагностичка испитивања у Европској референтној лабораторији за плави језик у Пирбрајту, Велика Британија, којим су у потпуности потврђени добијени резултати и утврђено је да се ради о серотипу 4 вируса болести, који је током 2014. године захватио већи дио Балканског полуострва.

5.2. Серолошки и молекуларни налаз друге групе

У оквиру пасивног надзора, дијагностичко–серолошко и молекуларно испитивање на катаралну грозницу спроведено је у случајевима изненадног оболевања говеда, оваца и коза са клиничким знацима који упућују или могу упућивати на сумњу да се ради о катаралној грозници.

Од откривања првог случаја катаралне грознице, на територији општине Даниловград, село Косић, дана 06. октобра 2014. године, прегледан је велики број узорака пореклом од клинички суспектних животиња и то 114 узорака пореклом од говеда, 302 узорка пореклом од оваца и 22 узорка пореклом од коза.

Дијагностиковани случајеви катаралне грознице код говеда, оваца и коза током 2014. године су приказани у табелама у прилогу ове дисертације.

Од првог појављивања болести 06. октобра, па до краја 2014. године, обољење је код говеда лабораторијски дијагностиковано серолошком ЕЛИСА методом у 57 случајева, а присуство секвенце РНК вируса болести плави језик је детектовано код укупно 45 говеда (прилог 1).

Током 2014. године, обољење је код оваца лабораторијски дијагностиковано серолошком ЕЛИСА методом у 109 случајева, а присуство секвенце РНК вируса код укупно 75 оваца (прилог 2).

Табела 15. Преглед дијагностикованих жаришта катаралне грознице током 2014. године

Врста преживара	Број жаришта	Број животиња у жариштима	Број болесних животиња	Морбидитет %	Број уинулих животиња	Морталитет %
Говеда	54	214	59	27,6	6	2,8
Овце	76	3861	158	4,1	71	1,8
Козе	1	3	3	100	0	0
УКУПНО	131	4078	220	5,4	77	1,9

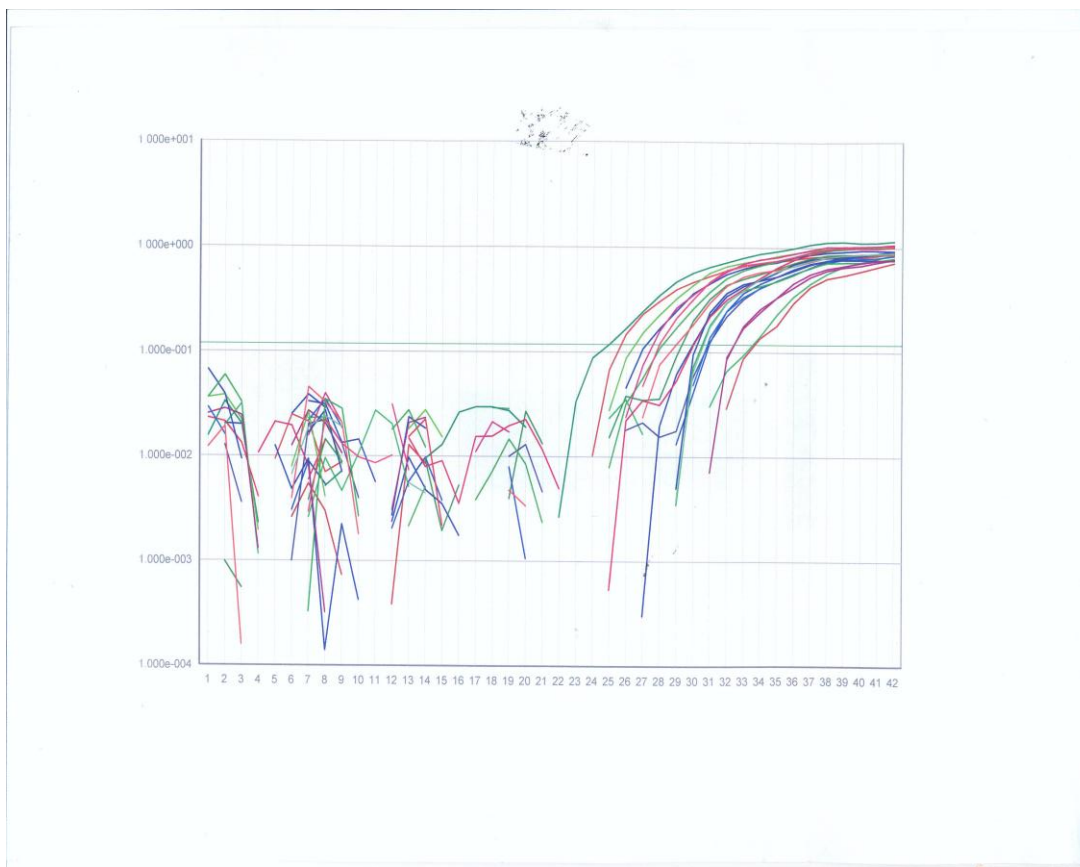
Географска дистрибуција жаришта катаралне грознице показује да се обољење јављало углавном у општинама које гравитирају ка југу Црне Горе (слика 25, табела 16).



Слика 25. Географска дистрибуција жаришта катаралне грознице у Црној Гори.

Табела 16. Број жаришта за сваку општину

Општина	Број жаришта
Даниловград	68
Херцег Нови	11
Подгорица	35
Улцињ	12
Бар	1
Будва	0
Цетиње	2
Котор	0
Никшић	1
Тиват	1
Андријевица	0
Беране	0
Бијело Поље	0
Колашин	0
Моковац	0
Плав	0
Пљевља	0
Плужине	0
Рожаје	0
Шавник	0
Жабљак	0
Укупно	131

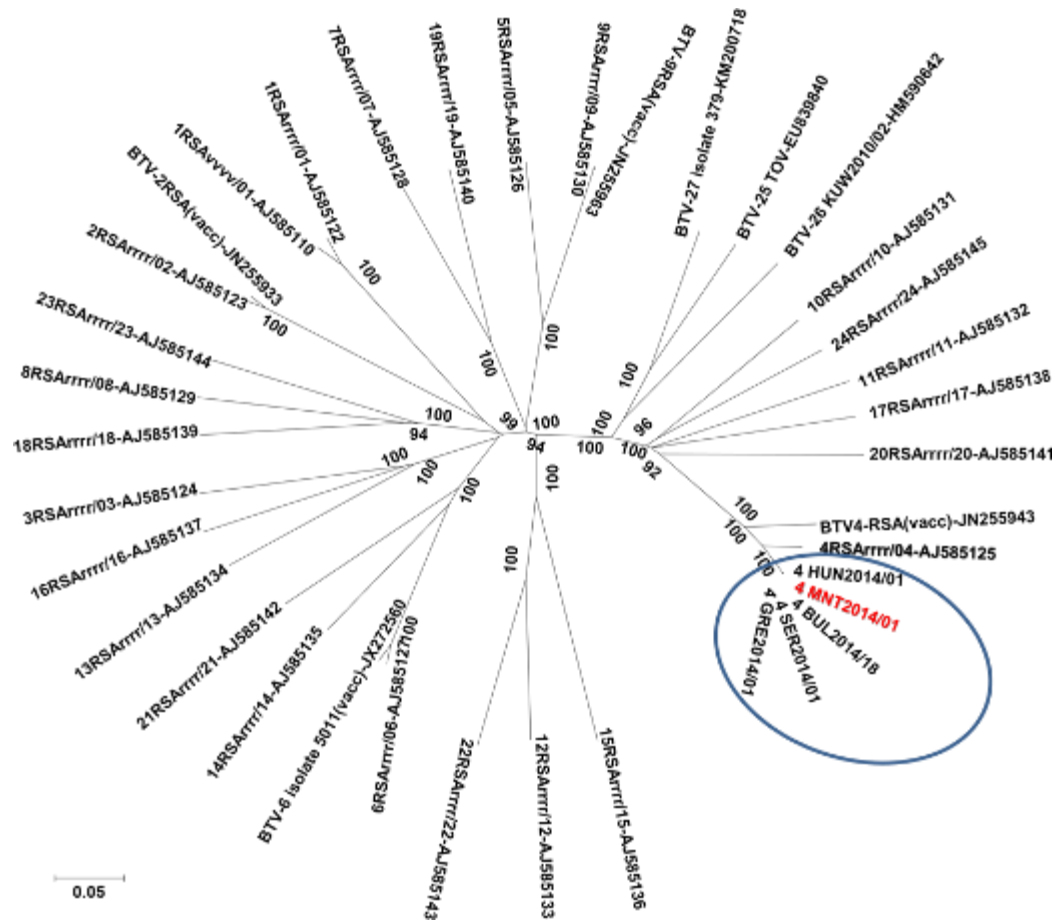


Графикон 3. Амплификационе криве дела тестираних 21 узорака

Из графикона 3, на х оси је приказан број циклуса, а на у оси ниво флуоресценције. Од 21 тестираног узорка у једном маху, 20 је било позитивно са C_t вредностима у интервалу од 25 до близу 34, док је један узорак био негативан.

Два узорка крви оболелих говеда (A162/14 -01 и -02) послата су у лабораторију у Пирбрајту ради потврде добијених резултата, утврђивања серотипа и секвенцирања. Оба узорка су дала позитиван резултат, а тестирани су методом RT-PCR која погађа групно специфични сегмент 10 генома вируса (Hofmann и сар., 2008) са C_t вредностима од 19-22. Узорци РНК су такође тестирани тип специфичном методом real-time RT-PCR за BTV-4 која погађа сегмент 2 генома са C_t вредностима од 20-22, чиме је потврђено присуство серотипа 4 у испитиваним узорцима.

Вирус је изолован на *Culicoides sonorensis* хелијској линији (КС хелије) из првог узорка (A162/14 01). Овај изолат је увршћен у колекцију референтних сојева (Orbivirus Reference collection at Pirbright) под бројем [MNT2014/01]. Секвенцирањем и филогенетском анализом Seg-2 из MNT2014/01 спроведеним од стране тима истраживача који врши молекуларна испитивања Arbovirus групе потврђена је BTV-4 идентификација MNT2014/01 (графикон 4). Анализа је показала да Сегмент-2 MNT2014/01 дели сличност са другим сојевима BTV-4 из Судана, Португалије, Шпаније, Корзике, Сардиније и Италије (са 95.5% - 94.1% истоветних нуклеотидних секвенци), показујући тиме да припада западном топотипу BTV-4 (Western topotype of BTV-4).



Графикон 4. Поређење Сегмент-2 нуклеотидне секвенце BTV-4 из Црне Горе (MNT2014/01) са 27 BTV референтних сојева (са секвенца приступним бројевима)

Секвенца сегмента -2 из MNT2014/01 је најсроднија са секвенцом Сегмента-2 BTV-4 изолата GRE2014/01 (јужна Грчка- регион Пелепоноза) показујући 99.9% нуклеотидне сличности и 100% нуклеотидне сличности са Сегментом-2 изолата BUL2014/18, BUL2014/07 (Бугарска), KOS2014/01 (Косово), SER2014/01 (Србија) и HUN2014/01 (Мађарска). Ово показује да је Сегмент-2 међу изолатима MNT2014/01, HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01 готово идентичан што указује на њихово заједничко порекло. Овакав степен истоветности би се могао очекивати за изолате из појединачних епидемија.

Геном сегмента-2 MNT2014/01 показује мањи степен сродства (72.8% нуклеотидне сличности / 72.4% нуклеотидне сличности) са сојевима источног топотипа BTV-4 из Кине (приступни број JX560414) и из Индије (приступни број KF560418).

Из свих наведених података може се закључити да изолат MNT2014/01 (заједно са HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01) представља нову интродукцију „западног топотипа“ BTV-4 у источно медитеранску и балканску регију Европе (Црна Гора, Мађарска, Србија, Косово, Бугарска и Грчка). Висок степен подударности Сегмента-2 MNT2014/01, HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01 указује да је у сваком случају Сегмент-2 дошао из истог извора за све наведене вирусне изолате без обзира што су пореклом из различитих земаља (прилог 4).

5.3. Макроскопски налаз

Овце послате у индустријске кланице на територији града Подгорице нису имале макроскопски промењене органе, за разлику од уинулих оваца. Обдуковано их је 20 са подручја општина Подгорица, Улцињ и Херцег Нови у обдукционој сали Специјалистичке ветеринарске лабораторије Подгорица. Од 20 обдукованих оваца промене на глави су биле изражене само код 5 уинулих оваца, док их код осталих 15 оваца није било. Сасушени хеморагични исцедак у пределу носног огледала и благи коњунктивитис имало је свих 5 оваца. Код оваца са израженим променама на глави само су код две овце (обе са подручја општине Херцег Нови) констатоване

промене на језику. Код једне овце, поред хеморагичног секрета у пределу носног огледала, промене на језику су биле јако изражене у смислу јаког едема и промене боје језика у модро плаву, а уз то је била изражена и протрузија језика. Код друге овце језик је био благо едематозан без промене боје и без протрузије, али са израженим улцерацијама на слuzници језика које су евидентирани и на слuzници усне дупље, нарочито на образима.



Слика 5. Оболела овца са сасушеним хеморагичним садржајем на носном огледалу



Слика 6. Хеморагични исцедак у пределу носног огледала, отечен и модар језик овце



Слика 7. Улцерације на језику овце

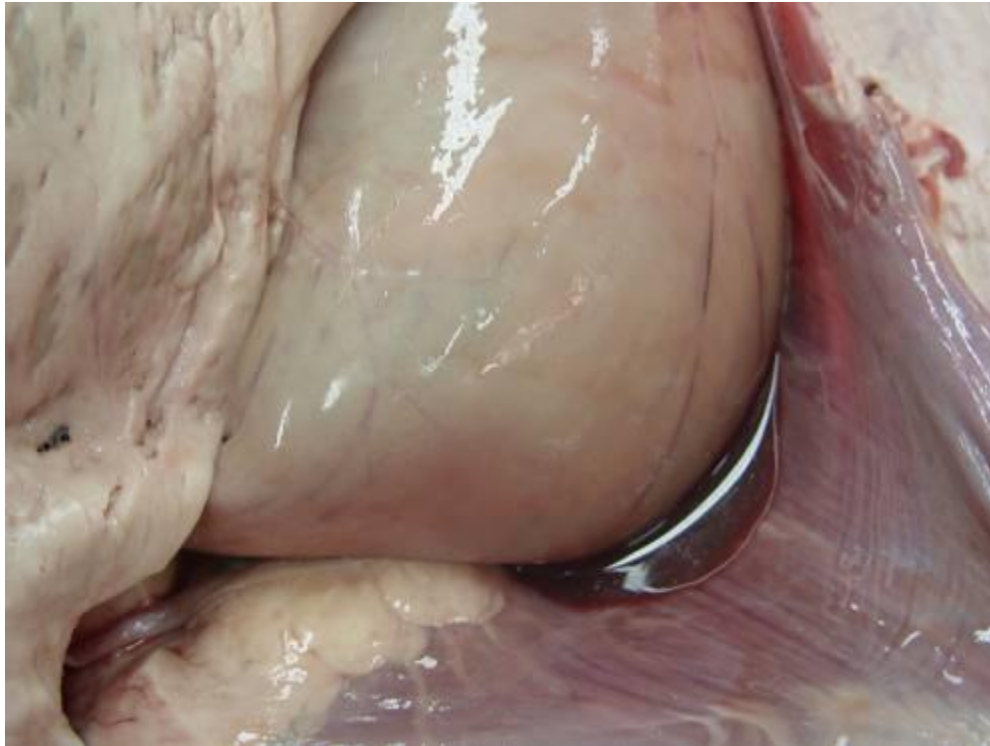
У току обдукције, при скидању коже запажена су крварења у поткожју и на мускулатури код свих обдукованих оваца.



Слика 8. Крварење у поткожном ткиву овце



Слика 9. Крварења у поткожју и мишићима овце



Слика 10. Хеморагична течност у трбушној дупљи

На преджелуцима, нарочито на бурагу јављају се крварења која се разликују по интензитету, некад су мање, некад више изражена, захватају мање или веће зоне, а често се пружају целом дебљином зида (слика 11). На нивоу цревно-мезентеријалне плоче евидентирају се хиперемија мезентеријалних крвних судова и крварења на самом мезентеријуму и припадајућем масном ткиву (слика 12) Мезентеријум је прожет хеморагичним инфилтрацијама, мезентеријални лимфни чворови су увећани и хеморагични, често су готово црне боје. На појединим сегментима танког и дебелог црева јављају се крварења која често захватају све слојеве цревног зида. На неким местима због интензивних крварења јавља се и тамна дисколорација цревног зида (слика 13).



Слика 11. Крварења у бурагу овце



Слика 12. Крварења на мезентеријуму, цревима и лимфним чворовима овце



Слика 13. Крварења на цревима и тамна дисколорација цревног зида овце



Слика 14. Лимфни чвор овце испуњен крвљу

На већини лимфних чворова изражена лимфаденопатија, лимфни чворови су увећани, отечени са интензивним крварењима при чему често крв испуњава цео лимфни чвор (слика 14)

Слезина је код већине обдукованих оваца била благо увећана, у неким случајевима је увећање било више изражено што се запажа и по заобљеним рубовима слезине. У појединим случајевима јасно се истичу субкапсуларне хеморагије (слика 15).



Слика 15. Благо увећана слезина са субкапсуларним крварењима

Бубрези су тамно црвене боје са јако израженом хиперемijом и крварењима код свих обдукованих оваца. Због изразитог интензитета наведених промена бубрези код појединих оваца имају боју труле вишње. Промене се јасно уочавају на пресеку бубрега при чему је кортекс загасито црвене боје, а у неким случајевима су и кора и срж бубрега тамно црвене боје без јасно уочљиве границе. Најинтензивније промењени бубрези су готово потпуно испуњени крвљу услед чега попримају веома тамну, готово црну дисколорацију. Крварења се запажају и на бубрежној карлици (слике 16 и 17).



Слика 16. Крварења у бубрегу и бубрежној карлици овце



Слика 17. Бубрег и бубрежна карлица овце испуњени крвљу

У ждрелу, трахеји и плућима запажају се хиперемија, едем и крварења. Све обдуковане овце имале су јако изражену плућну хиперемију и едем са нагомилавањем хеморагичне течности у плеуралној дупљи (слике 19 и 20). Плућа су, због наведених промена, изразито тамне црвене боје, а на пресеку се из плућног паренхима цеди пенушави хеморагични садржај (слика 21). Пенушави садржај је присутан и у трахеји. Код појединих оваца у пенушавом садржају трахеје запажене су и партикуле хране које су доспеле аспирацијом садржаја из ждрела (слика 22).



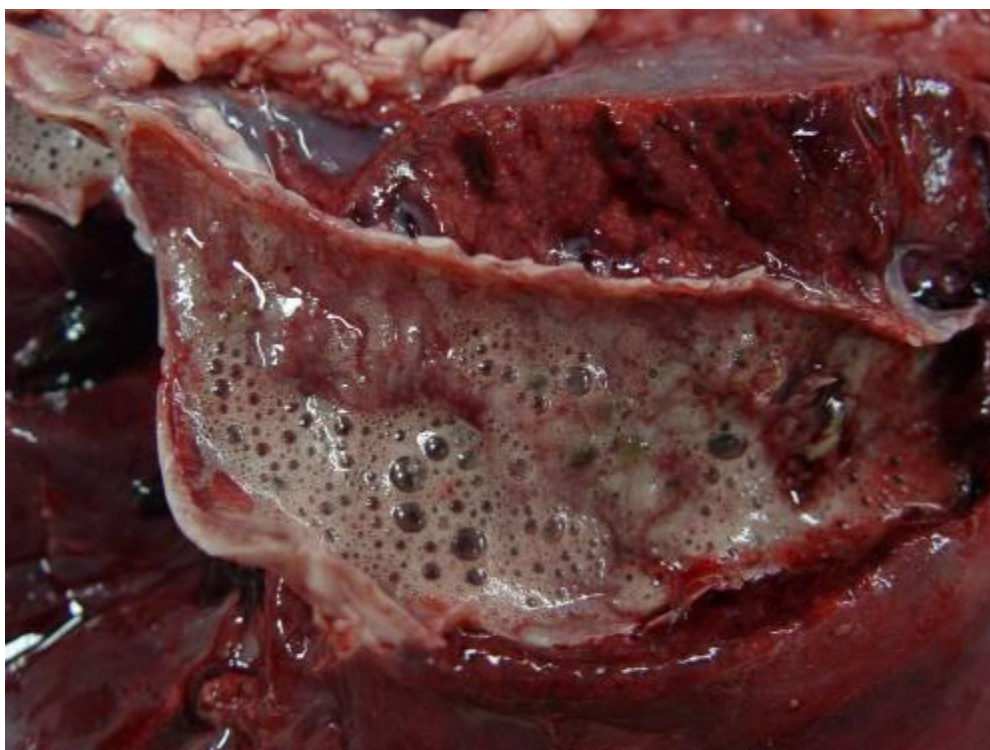
Слика 18. Увећана плућа овце испуњена крвљу



Слика 19. Плућни едем и крварења



Слика 20. Плућни паренхим на пресеку са пенушавим хеморагичним садржајем



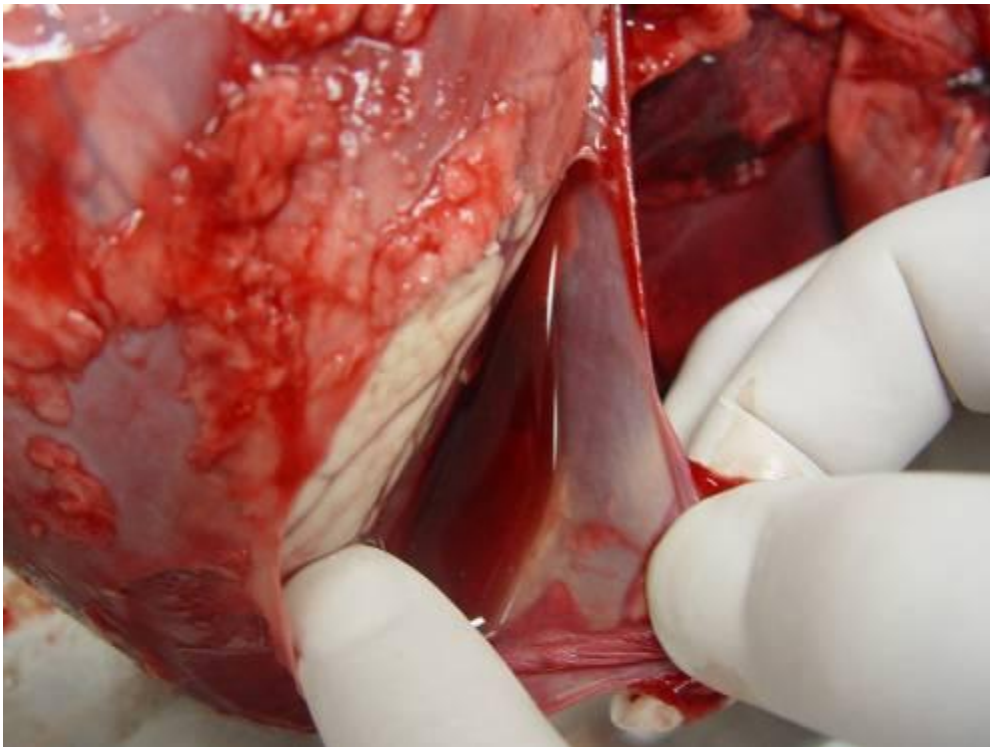
Слика 21. Крварења у трахеји и пенушави садржај са партикулама хране

Код свих обдукованих оваца регистровано је накупљање знатне количине течности у перикардијалној дупљи (слика 22). Накупљена течност је ретко била серозног карактера (хидроперикардијум), већ углавном хеморагичног карактера (хемоперикардијум) (слика 23).

Након отварања перикарда, на епикарду се уочавају тачкаста и пругаста крварења (слика 24). Крварења су била заступљена на пулмоналној артерији (која се сматрају патогномичним) и ређе на аорти. У неким случајевима су била у питању не лако уочљива субинтимална крварења, а у већини случајева крварења су била лако уочљива и углавном лоцирана у близини базе пулмоналне артерије (слике 25 и 26). Након отварања срчаног мишића евидентирају се и ендокардијалне хеморагије, хеморагије на срчаним залисцима те локална папиларна некроза (слика 27). Хеморагична компонента на срцу и плућима у неким случајевима је била екстремно изражена (слика 28).



Слика 22. Накупљање течности у перикардијалној дупљи



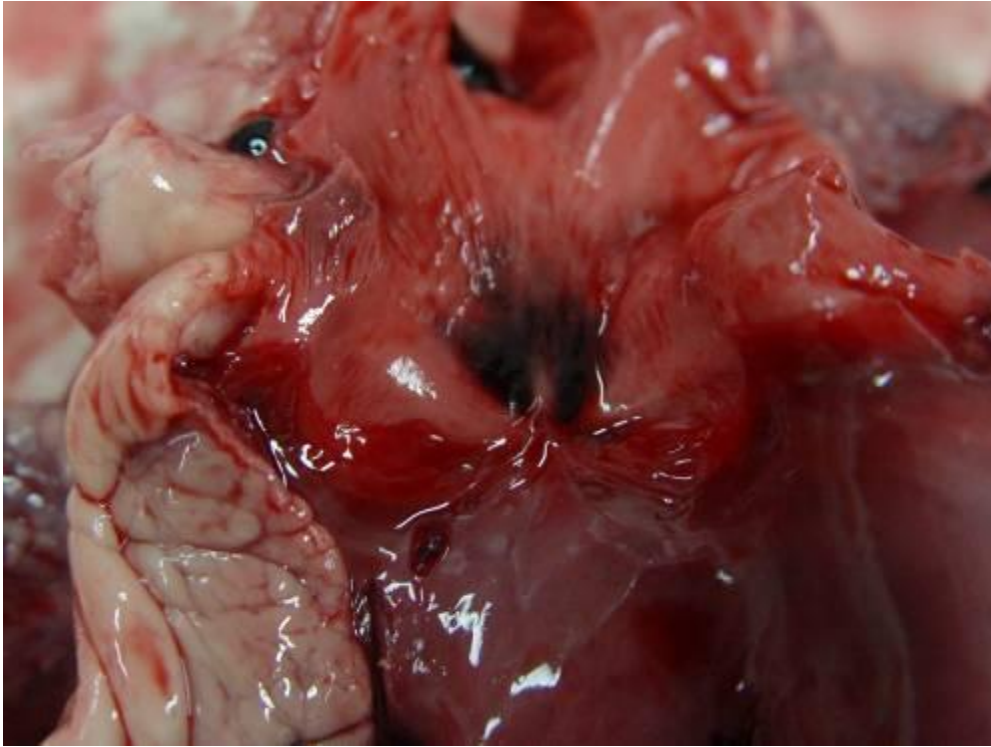
Слика 23. Хеморагична течност у перикардијалној дупљи



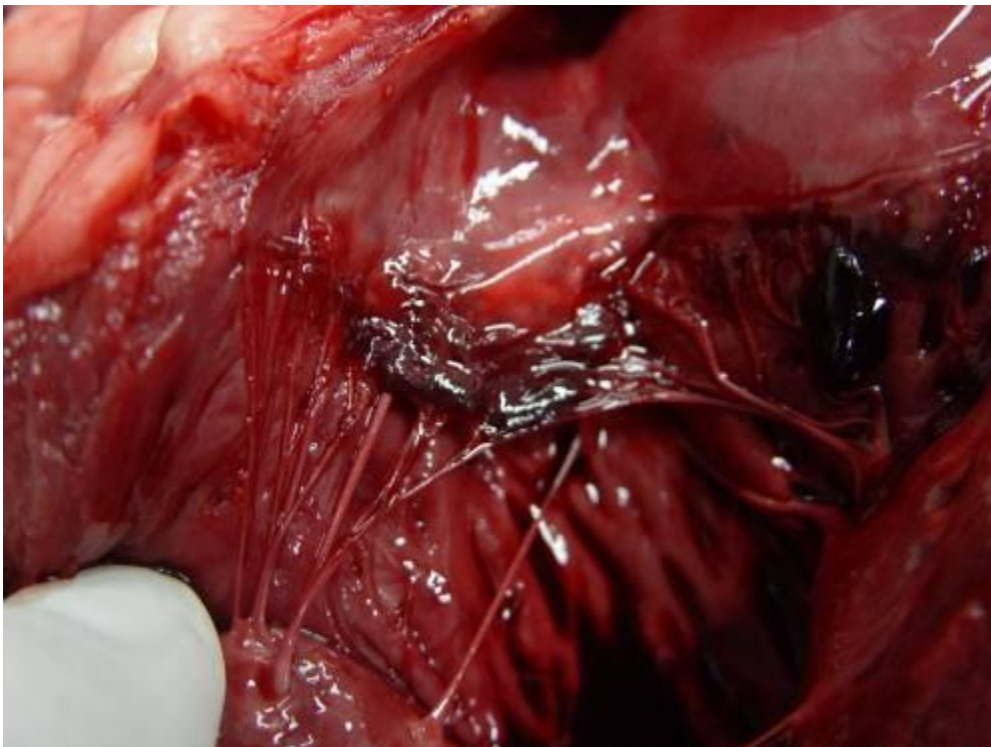
Слика 24. Крварења на епикарду овце



Слика 25. Крварења на бази пулмоналне артерије овце



Слика 26. Крварења на бази пулмоналне артерије са унутрашње стране



Слика 27. Ендокардијалне хеморагије овце



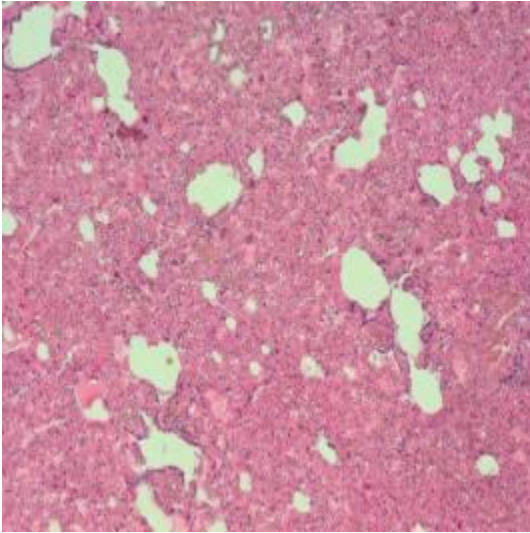
Слика 28. Веома интензивна хиперемија и крварења на срцу и плућима

5.4. Микроскопски налаз

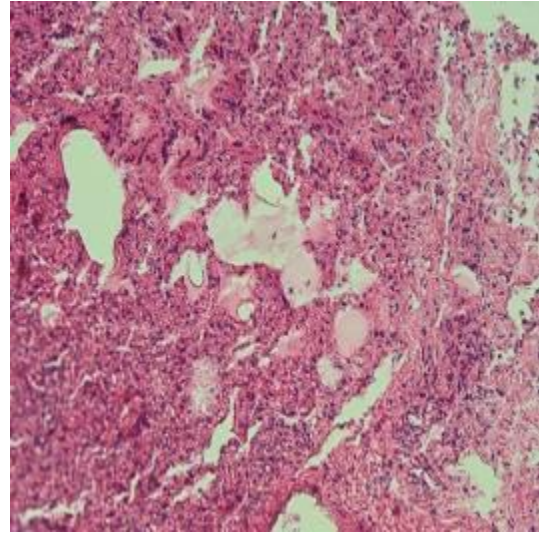
Хистолошке промене које су нађене код обдукованих оваца су последица оштећења крвних судова, те због тога у хистолошкој слици доминирају едем, хиперемија и крварења. Промене су нађене на плућима, срцу, једњаку, бубрезима, јетри, слезини, лимфним чворовима и тимусу.

5.4.1. Патохистолошки налаз на плућима

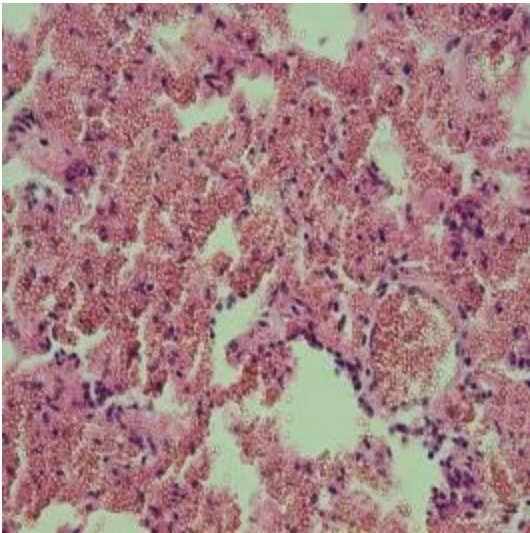
Микроскопским прегледом исечака плућа запажа се плућни едем како интерстицијални тако и интраалвеоларни. Плућна хиперемија и интензивне хеморагичне инфилтрације плућног ткива су оно што доминира у патохистолошком налазу плућа (слике 29-32).



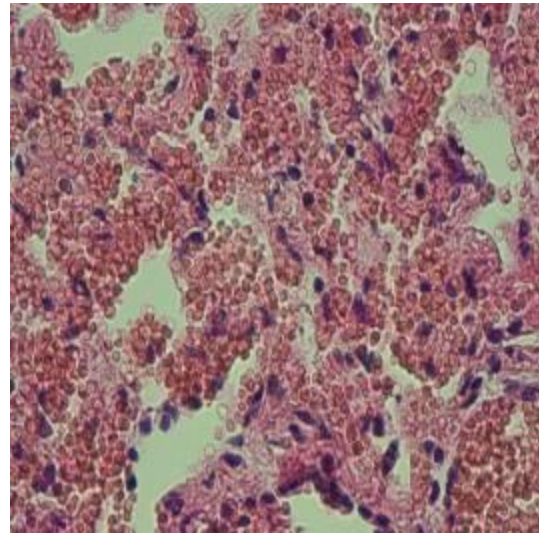
Слика 29. Плућа, HE, 50x



Слика 30. Плућа, HE, 100x



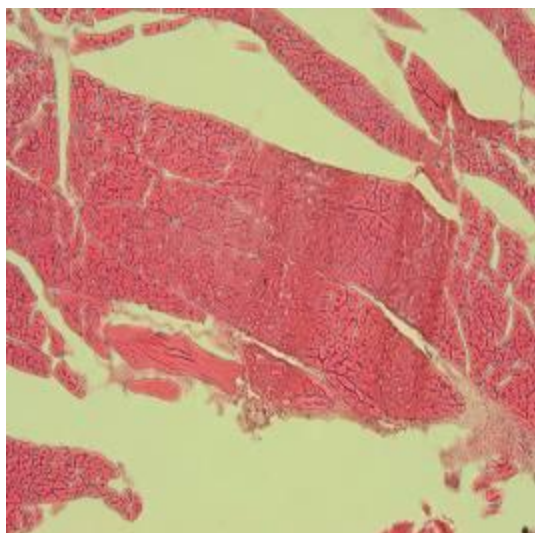
Слика 31. Плућа, HE, 200x



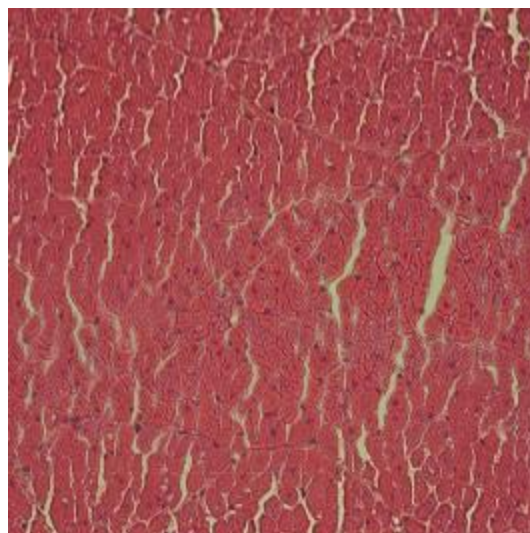
Слика 32. Плућа, HE, 400x

5.4.2. Патохистолошки налаз на срцу

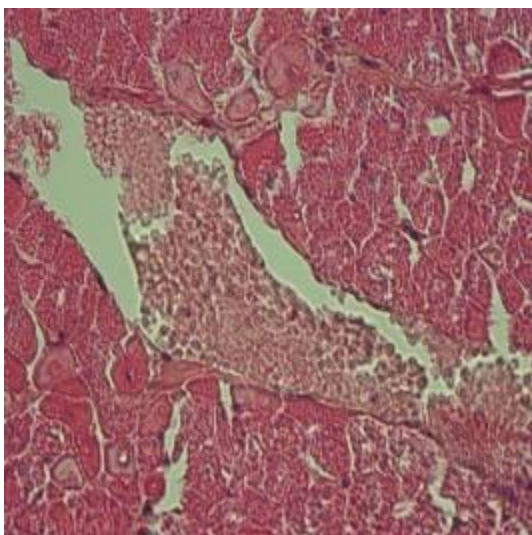
Микроскопским прегледом исечака срца запажа се едем, хиперемија и местимични некротични процеси у миокарду (слике 33-35).



Слика 33. Срце, HE, 100x



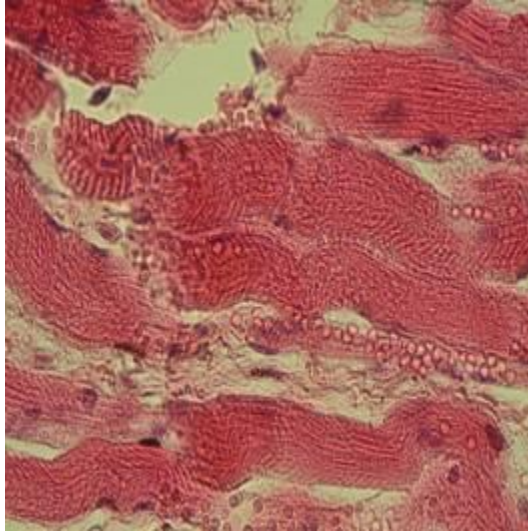
Слика 34. Срце, HE, 200x



Слика 35. Срце, HE, 400x

5.4.3. Патохистолошки налаз на језику

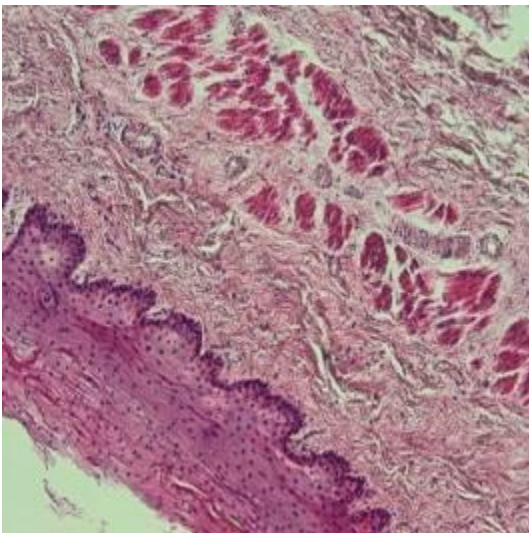
Микроскопским прегледом исечака језика запажа се едем, местимична некроза мишићних влакана и крварења (слика 36).



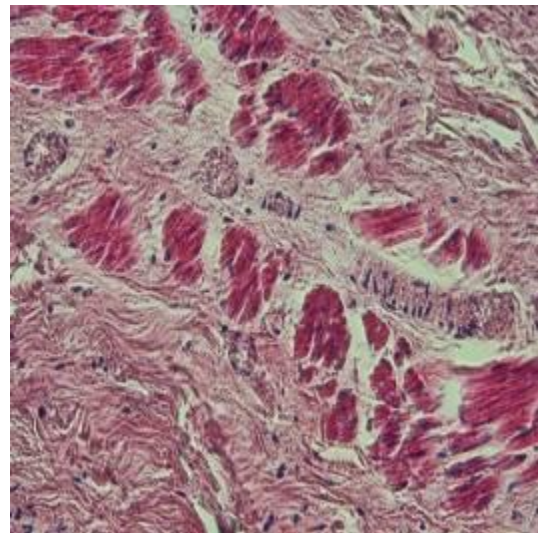
Слика 36. Језик, 400x

5.4.4. Патохистолошки налаз на једњаку

Микроскопским прегледом исечака једњака запажа се хиперемија крвних судова у крзну и местимичне хеморагичне инфилтрације у крзну и мишићној ламини слузнице (слике 37 и 38).



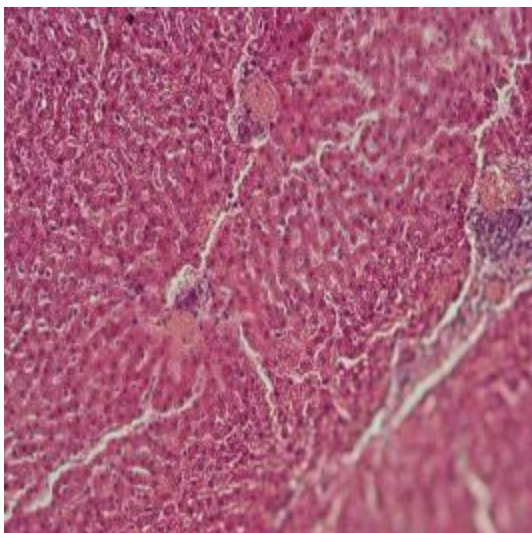
Слика 37. Једњак, HE, 100x



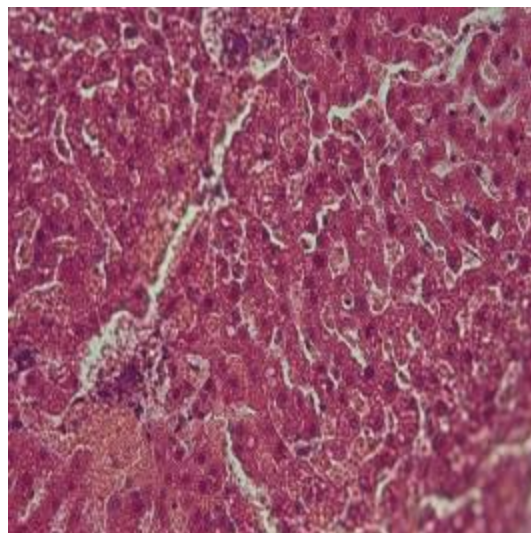
Слика 38. Једњак, HE, 200x

5.4.5. Патохистолошки налаз на јетри

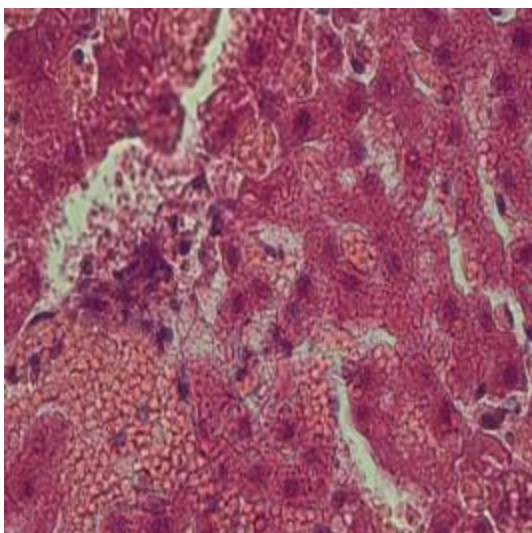
Микроскопским прегледом исечака јетре запажа се хиперемија и хеморагичне инфилтрације јетриног паренхима. Еритроцити се налазе дифузно расути између Ремаркових гредица (слике 39-41).



Слика 39. Јетра, HE, 100x



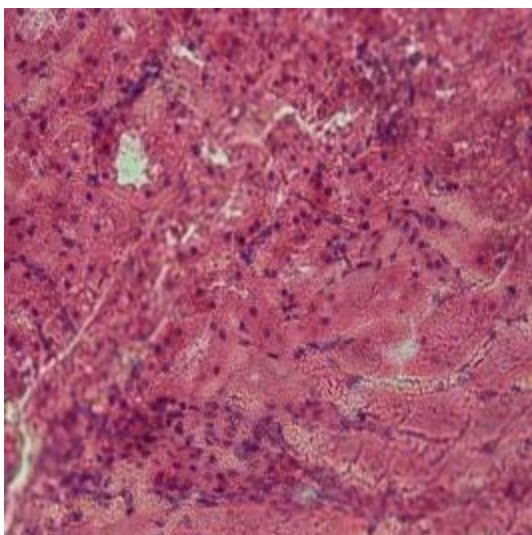
Слика 40. Јетра, HE, 200x



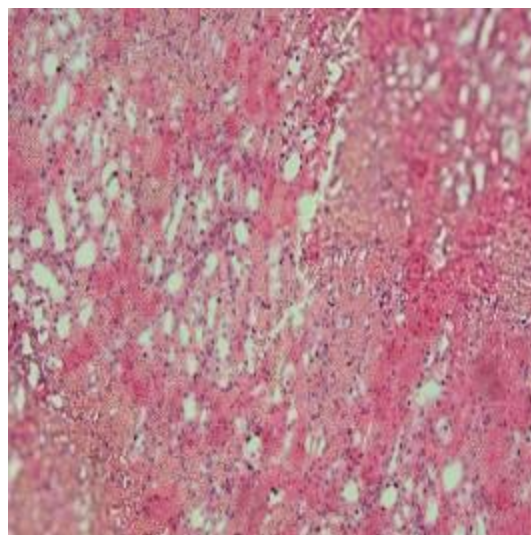
Слика 41. Јетра, HE, 400x

5.4.6. Патохистолошки налаз на бубрезима

Микроскопским прегледом исечака бубрега запажају се интензивне хеморагичне инфилтрације целокупног бубрежног ткива. Бројни хеморагични екстравазати инфилтрирају просторе између бубрежних каналића и гломерула тако да је на многим местима паренхим бубрега знатно редуциран (слике 42 и 43).



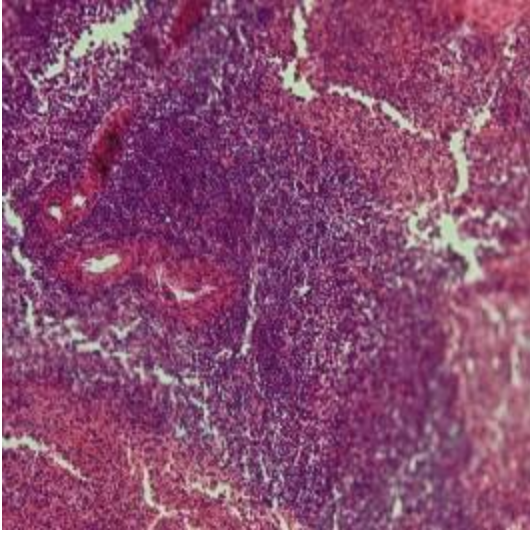
Слика 42. Бубрег, HE, 200x



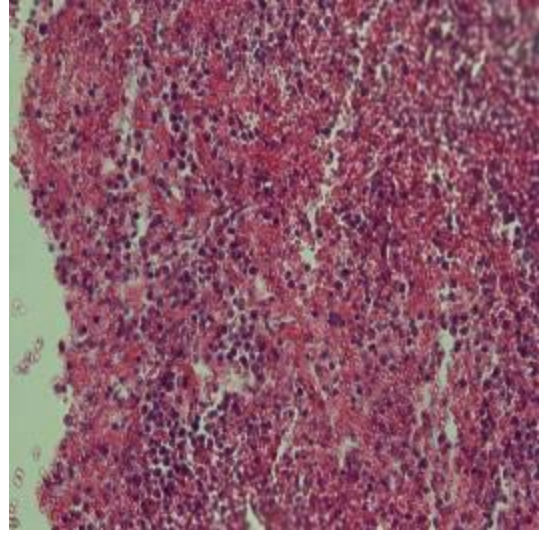
Слика 43. Бубрег, HE, 400x

5.4.7. Патохистолошки налаз на слезини

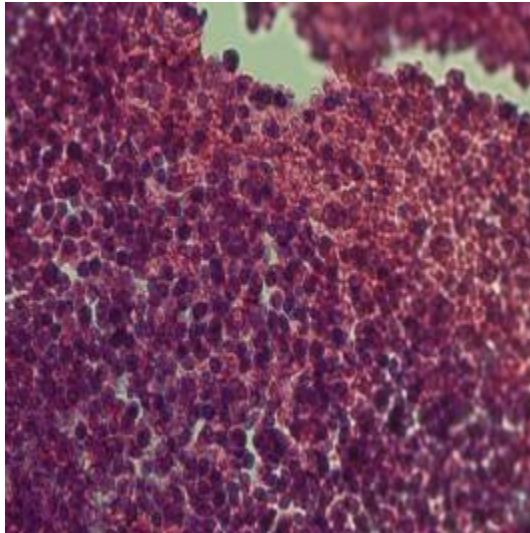
Микроскопским прегледом исечака слезине запажа се снажна хиперемича и хеморагичне инфилтрације ткива слезине. Између лимфоцита налазе се дифузно расути бројни еритроцити. Запажа се и хипоцелуларност лимфоидних фоликула слезине (44-46).



Слика 44. Слезина, HE, 200x



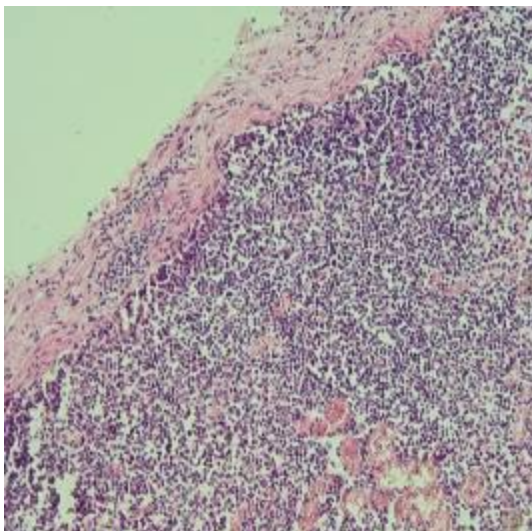
Слика 45. Слезина, HE, 100x



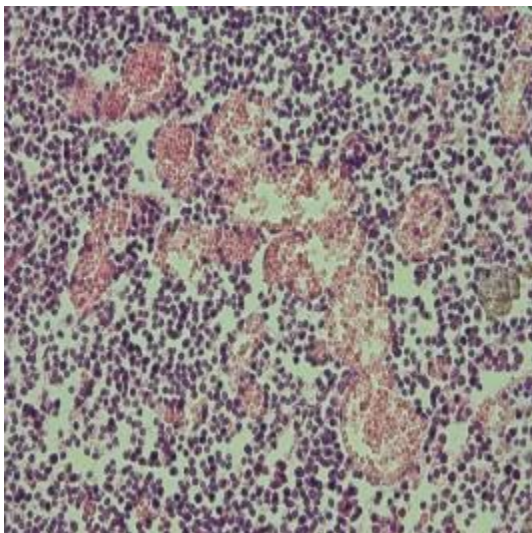
Слика 46. Слезина, HE, 400x

5.4.8. Патохистолошки налаз на тимусу

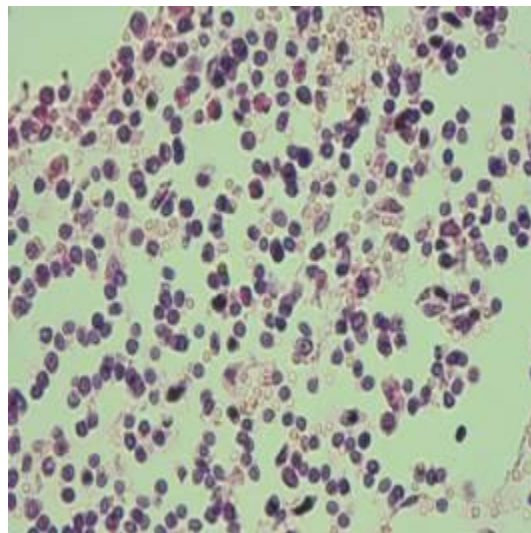
Микроскопским прегледом исечака тимуса запажа се лимфоцитна деплеција, хиперемија и хеморагичне инфилтрације (47-49).



Слика 47. Тимус, HE, 100x



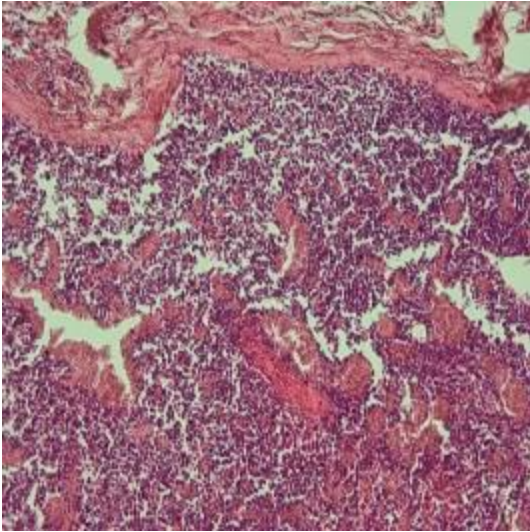
Слика 48. Тимус, HE, 200x



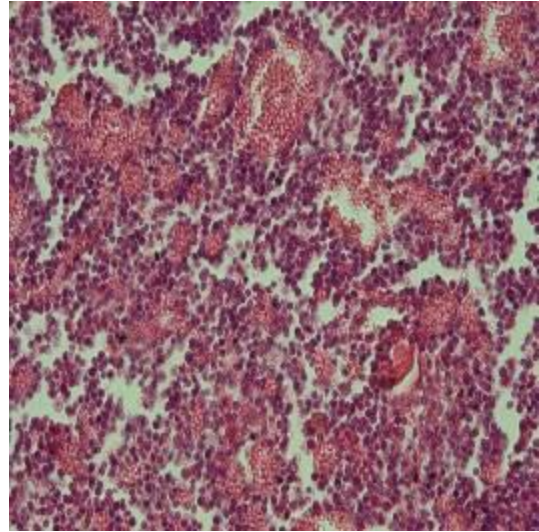
Слика 49. Тимус, HE, 400x

5.4.9. Патохистолошки налаз на лимфним чворовима

Микроскопским прегледом исечака лимфних чворова запажа се хипоцелуларност лимфоидних фоликула, изразита хиперемија и врло интензивне хеморагичне инфилтрације при чему су еритроцити дифузно расути између лимфоцита (слике 50 и 51).



Слика 50. Лимфни чвор, HE, 100x



Слика 51. Лимфни чвор, HE, 200x

6. ДИСКУСИЈА

За успешну контролу катаралне грознице оваца неопходни су прецизни подаци о заступљености и раширености обољења. Извор ових података је дијагностичка лабораторија у којој се користе адекватне методе којима се идентификују животиње које су инфициране или су биле инфициране вирусом, узрочником катаралне грознице оваца. Добра сарадња целокупне ветеринарске службе је свакако неопходна, јер је лабораторија једна карика у ланцу извшилаца ветеринарских активности. Посебно се истиче значај добре сарадње теренске ветеринарске службе и лабораторије што је потврђено и овај пут када је у питању катарална грозница оваца. Како је болест постала регионални проблем у 2014. години, поред активног надзора, акценат је стављен на пасивни надзор са обавезом хитног извештавања лабораторије уколико се посумња, на основу клиничких симптома, да се ради о катаралној грозници оваца. Познавање клиничке слике болести је први корак у њеном препознавању. Међутим, катарална грозница оваца се поред акутне форме болести може испољити и као субакутна и хронична форма када клинички симптоми нису јасно изражени. Поред тога, код говеда и коза болест се ретко клинички манифестује (Tweedle и Mellor, 2002) што ипак није правило, пошто су инфицирана говеда у Европи током епидемије узроковане серотипом 8 која је избила у периоду 2006-2008. године испољила клиничку слику у пуној форми (Elbers и сар., 2008b) као и козе током епидемије у Холандији 2006. године (Derckens и сар., 2007).

У оквиру активног надзора над болешћу, откривен је први случај болести катаралне грознице оваца у Црној Гори након 2001. године и то код једне краве на територији општине Даниловград, село Косић, (ид.број: МЕ 12979325) дана 06.10.2014. године. Крава је била серолошки позитивна, а позитиван серолошки резултат потврђује да је животиња била инфицирана вирусом, али није доказ тренутне инфекције те у областима где има болести највећи део серопозитивних јединки није инфициран (Barratt-Boyes и MacLachlan, 1995; Vonneau и сар., 2002; Gibbs и Greiner, 1994; MacLachlan и сар., 1994; Singer и сар., 2001; Tabachnik и сар.,

1996). Серолошки налаз је потврђен у поновном серолошком испитивању, а потом је доказана и секвенца вирусне РНК. Након тог случаја обољење је, у оквиру активног надзора, потврђено код говеда и на територији општине Бар у 8 случајева, која клинички нису испољавала било какве симптоме чиме је потврђена чињеница да манифестација болести код говеда није тако честа појава.

Међутим, у оквиру пасивног надзора, током даљих испитивања, катарална грозница је потврђена у више од 112 случајева што код говеда што код оваца до краја новембра 2014. године, на територији општина Никшић, Даниловград, Подгорица, Цетиње, Улцињ, Бар, Тиват и Херцег Нови. На основу испољене клиничке слике код говеда, која је у највећем броју случајева манифестована као повишена телесна температура, коњунктивитис и исцедак из носа, узорковано је 114 узорака крви који су испитани серолошки и PCR техником. Према литературним подацима клиничка манифестација болести код говеда је врло ретка (Tweedle и Mellor, 2002) што није био случај са инфекцијом која је погодила Европу чији је узрочник био BTV-8 током које су многе животиње испољиле симптоме болести (Elbers и сар., 2008b). Болест је у почетку праћена температуром, апатијом, депресијом, а потом се јављају ерозије и некрозе оралне и назалне слузнице. Такође се јавља исцедак из носа, интензивна саливација, коњунктивитис, шепавост и укоченост, улцеративни дерматитис, коронаритис, повремено пролив са примесама крви, едем и хиперемија. Кожа на сисама је често упаљена са пукотинама и љуспицама (Tweedle и Mellor, 2002; Thiry и сар., 2006; Williamson и сар., 2008; Elbers и сар., 2008a, 2009). Млечне краве смањују продукцију млека (Thiry и сар., 2006; Mehlhorn и сар., 2008; Elbers и сар., 2009). Инфекција у раном стадијуму гравидитета може резултирати раним ембрионалним морталитетом са ресорпцијом ембриона. Такође, може доћи до побачаја или доношења на свет слабашних телата са малформацијама (MacLachlan и сар., 2000; Tweedle и Mellor, 2002; Elbers и сар., 2008a; Desmecht и сар., 2008). Ако гравидне женке преживе, фетуси инфицирани између 70 и 130 дана гестације имају малформације на централном нервном систему попут хидроцефалуса и разних церебралних дефеката, док они инфицирани неколико недеља пре доласка на свет обично

показују симптоме блажег енцефалитиса (Waldvogel и сар., 1992; MacLachlan и сар., 2000).

Серолошким испитивањем крви говеда сумњивих на катаралну грозницу утврђено је присуство антитела код 57 говеда што значи да је код половне испитаних говеда тј. 50% утврђено присуство антитела, а секвенца вирусне РНК је детектована код 45 говеда односно код 39,5% испитаних говеда с назнаком да би овај проценат вероватно био и већи да је у свим случајевима било могуће потврдити PCR техником серолошки налаз. Наиме, у 12 случајева није достављена крв неопходна за потврду серолошког налаза PCR техником. У једном случају нису детектована антитела, али јесте секвенца вирусне нуклеинске киселине што би могло значити да је у питању нови сој вируса катаралне грознице оваца и да антитела још увек нису присутна у потребном титру за детекцију серолошким методом. На основу изложеног, сасвим је јасно да је код готово половине сумњивих говеда на катаралну грозницу, клинички налаз потврђен лабораторијским испитивањем што говори да је током избијања епидемије у Црној Гори у задњем кварталу 2014. године знатан број говеда испољио клиничке симптоме болести чиме је потврђена чињеница да је, иако знатно ређа и блажа него код оваца, клиничка симптоматологија катаралне грознице код говеда у Црној Гори била сасвим јасно испољена. Доминантни клинички симптоми су били: повишена телесна температура, коњунктивитис и исцедак из носа. Запажа се сличност са великом епидемијом катаралне грознице оваца у Европи између 2006-2008 године узроковане серотипом 8 (Wilson и Mellor, 2009) која је, између осталог, била карактеристична и по томе што је поред оваца погодила говеда и козе код којих је болест манифестована у пуној клиничкој форми. Дакле, серотип 4 вируса катаралне грознице оваца који је погодио Црну Гору је изазвао и клинички манифестно обољење код говеда узрокујући чак и изванредан постотак смртности.

Од укупно 214 говеда из 54 евидентирана жаришта морбидитет је био 27,6% (59 јединки), а морталитет 2,8% (6 јединки). Вредност морбидитета (27,6%) говеда у Црној Гори је била већа него у Албанији (4,5%), Бугарској (0,5%), Хрватској (13%), Македонији (2,5%), Грчкој (3,5%), Мађарској (5,5%), Румунији (14%), Србији (6,5%) и Турској (0%). Вредност морталитета (2,8%) код говеда у

Црној Гори се такође показала вишом у односу на све земље из региона у којима су забележене следеће вредности: Албанија (0%), Бугарска (0,04%), Македонија (0,83%), Грчка (0,52%), Србија (1,1%), Хрватска (0%), Мађарска (0,1%), Румунија (0,3%) и Турска (0%), (ОИЕ, 2014, 2015). Вредност леталитета код говеда у Црној Гори је износила 10,1% и била је нижа него у Македонији (35%), Грчкој (14,5%) и Србији (17%), а виша него у Бугарској (9,5%), Румунији (2%), Мађарској (2%), док у Албанији, Хрватској и Турској нису забележена угинућа. Наведене вредности за морбидитет, морталитет и леталитет говеда из осталих држава региона су из базе података ОИЕ на дан 31.12.2014 (ОИЕ, 2014).

Клиничка слика оболелих оваца испољила се било у мањем или већем степену, а кретала се у интервалу од повишене температуре, коњунктивитиса и исцетка из носа до карактеристичних промена као што су хеморагични исцедак из носа са стварањем краста, отечен и модар језик са улцерацијама. Сасушени хеморагични исцедак из носа и благи коњунктивитис нађен је код 5 оваца. Код оваца са израженим променама на глави само су код две овце (обе са подручја општине Херцег Нови) нађене промене на језику. Код једне овце, поред хеморагичног секрета у пределу носног огледала, промене на језику су биле јако изражене у смислу јаког едема и промене боје језика у модро плаву, а уз то је била изражена и протрузија језика. Код друге овце, језик је био благо едематозан без промене боје и без протрузије, али са израженим улцерацијама на слузници које су евидентирани и на слузници усне дупље, нарочито на образима. Овај, претходно описан налаз се подудара са литературним подацима многих аутора (Tweedle и Mellor, 2002; Elbers и сар., 2008b; Elbers и сар., 2008c) у којима стоји да се катарална грозница код оваца манифестује у акутној, субакутној и хроничној форми. Након инкубационог периода, који траје од четири до осам дана, јавља се грозница праћена високом температуром која често прелази 40°C, а достиже и до 42°C. Убрзо уследи апатија, тахипноја, појављује се хиперемија у пределу носног огледала и усана праћена појачаном саливацијом. У почетку се јавља бистри серозни исцедак из носа који убрзо прелази у мукопуруленти. Његовим сасушивањем у пределу ноздрва настају красте. Појављују се едеми на језику, уснама и субмандибуларном подручју, а понекад и на ушима. Петехије се јављају

на коњунктивама, а често и улцерације на слузокожи уста. Не тако често може да се уочи цијанотичан језик. Оболене јединке често држе отворена уста са протрузијом језика. У неким случајевима може се јавити отежано дисање, профузна хеморагична дијареја и повраћање које каткад може узроквати настанак аспирационе пнеумоније. При крају фебрилне фазе често се запажа појава коронитиса, ламинитиса, затим парезе и некрозе попречнопругасте мускулатуре чему доприноси недостатак воље за кретањем и неправилан став са погрбљеним леђима. Могу се јавити тортиколис, дерматитис и местимични недостатак вуне (Brewer и MacLachlan, 1994; Tweedle и Mellor, 2002; Darpel и сар., 2007; Elbers и сар., 2008а, 2009; Kirschvink и сар., 2009). Инфекција гравидних оваца може довести до побачаја, мумификације фетуса или рођења слабашне младунчади са честим конгениталним дефектима као што су церебралне цисте, ретинална дисплазија, хидроцефалус итд. (Osburn и сар., 1971; Osburn, 1994; MacLachlan и сар., 2000; Tweedle и Mellor, 2002; Saegerman и сар., 2011). У хроничној форми болести животиње могу подлећи услед развоја других болести као што је бактеријска пнеумонија (MacLachlan и Gard, 2009). Код оваца са ензоотских подручја болест је прилично блага и често прође као инапаратна инфекција. Заправо, болест може бити испољена као абортивна форма код које, након фебрилне фазе, нема развоја локалних лезија и као субакутна форма код које су лезије минималне, али је изражена јака слабост и дуг период реконвалесценције са могућношћу појаве секундарних бактеријских инфекција. Животиње које успеју да се опораве имају веома малу економску вредност (Radostitis и сар., 2007).

Током 2014. године, лабораторијски је испитано 302 узорка пореклом од оваца и обољење је лабораторијски дијагностиковано серолошком ЕЛИСА методом у 109 случајева (36%), а присуство секвенце РНК вируса код укупно 75 оваца (24,8%) с тим што би овај број вероватно био већи да је од свих серопозитивних оваца достављен узорак и за PCR анализу. Заправо, за анализе утврђивања секвенце РНК вируса није достављено 32 узорка. У два случаја серолошким испитивањем није утврђено присуство специфичних антитела, док је утврђено присуство секвенце РНК вируса што је вероватно последица скоре

инфекције те због тога титар антитела у крви није достигао потребан ниво за детекцију серолошким методом.

Од укупно 3861 овце колико их је било у 76 евидентираних жаришта регистрован је морбидитет од 4,1% (158 оваца) и морталитет од 1,8 % (71 овца). Морбидитет оваца (4,1%) у Црној Гори у поређењу са морбидитетом оваца земаља из региона је био мањи него у Албанији (20,5%), Бугарској (5,5%), Хрватској (6,5%), Македонији (6%), Грчкој (11%), Србији (9,5%) и Турској (5%), а већи него у Мађарској (1,5%) и Румунији (3,5%). Поређећи вредност морталитета оваца у Црној Гори (1,8%) са вредностима морталитета оваца држава из окружења утврђено је да је морталитет био нижи него у Албанији (3,4%), Бугарској (1,9%), Грчкој (4,3%) и Србији (3,6%), а виши у односу на Македонију (1,7%), Румунију (1%) и Турску (0,3%) уз напомену да је у Турској након појаве болести августа 2014. године уследила вакцинација пријемчивих животиња. Морталитет оваца у Црној Гори и Хрватској је био идентичан (1,8%). Вредност леталитета оваца у Црној Гори је износила 45% и била је виша него у Албанији (16,5%), Бугарској (33,5%), Хрватској (28,5%), Македонији (28,5%), Грчкој (39%), Мађарској (14,5%), Румунији (28,5%) Србији (38%) и Турској (7%). Поређења ради, морбидитет оваца након избијања епидемије изазване серотипом 8 вируса 2006. године у Холандији је био низак, али је леталитет достигао вредност од 50%. Леталитет код говеда је био 13 пута нижи, али је до 80% инфицираних говеда показало јасне симптоме болести (Elbers и сар., 2008с). Наведене вредности за морбидитет, морталитет и леталитет оваца из осталих држава региона су из базе података ОИЕ на дан 31.12.2014.

У току пасивног мониторинга над болешћу, благе клиничке симптоме који су упућивали на сумњу да се ради о катаралној грозници испољиле су три козе из једног жаришта у Улцињу. Козе не оболевају тако често као овце и ретко се развија клиничка слика. Ако се развију симптоми, слични су онима код оваца, али нису тако озбиљни. Током 2006. године избила је епидемија у Холандији, а оболеле козе су имале изненадни пад продукције млека, потом високу температуру, едем усана и главе, носни исцедак и красте на носу и уснама, еритем коже вимена и мала поткожна крварења (Derckens и сар., 2007).

Све три козе су серолошким прегледом показале присуство специфичних антитела, али је само код једне козе доказано присуство секвенце РНК вируса. Морбидитет је због тога износио 100%, а морталитета није било. Морбидитет и морталитет коза услед инфекције серотипом 4 вируса су регистровани у региону југоисточне Европе који је погођен у 2014. години. У Бугарској и Румунији је морбидитет коза износио испод 0,5%, при чему су у Бугарској 4 од 93 козе са клиничким симптомима угинуле што даје леталитет од 4,5% док су у Румунији 3 козе од 22 са клиничким симптомима угинуле што је леталитет од 13,5%. У Хрватској је морбидитет износио 9%, морталитет 1,5%, а леталитет 17%. У Македонији је морбидитет био 3,5%, морталитет 0,75%, а леталитет 21,5%. Грчка је имала морбидитет од 2%, морталитет 0,5%, а леталитет 26%. У Мађарској је морбидитет износио 7,5%, морталитет 7,5 % и леталитет 100%, јер од 13 коза у жаришту једна је показала клиничке симптоме и на крају угинула. Морбидитет коза у Србији је износио 3%, морталитет 1%, а леталитет 34,5%. У Албанији и Турској није било угинућа, барем нису пријављена (ОИЕ, 2014).

На свеукупну клиничку манифестацију болести утичу фактори везани за домаћина, али и они везани за самог узрочника као што су специфични серотип или сој самог вируса (Carogale и сар., 2014; MacLachlan и сар., 2009). Свих 27 познатих серотипова вируса узрокују обољење са разликама у степену манифестације и варијабилне нивое унакрсне заштите. Међутим, акценат је, због његове високе вируленције, посебно стављен на серотип 8 вируса, иако у Европи годинама перзистира бар 11 различитих серотипова. Рана експериментална испитивања спроведена инокулацијом оваца са инфективном крвљу која је садржала серотип 8 вируса су указала на високу патогеност серотипа 8 који је узроковао морталитет и до 72%. У истом експерименту серотип 4 вируса генерално није узроковао морталитет. Исто тако нису уочене разлике у вируленцији два соја серотипа 3 (Neitz, 1948). Тежина клиничких симптома није обавезно у корелацији са степеном морталитета код оваца. Овце експериментално инфициране серотипом 3 су показале благу до средње изражену клиничку слику, али је већина на крају угинула, док оне инфициране серотипом 5 манифестују озбиљну клиничку слику, али се углавном опораве (Howell и сар., 1970). Варијације су постојале у експресији

клиничке слике и mortalitetу између других серотипова (BTV-4, BTV-10 и BTV-16) од којих је серотип 4 узроковао највећи mortalitet (Goldsmiт и сар., 1975).

Многобројни подаци указују да ипак припадност одређеном серотипу није поуздана детерминанта патогености неког изолата. Наиме, поређењем вируленције сојева пореклом из Аустралије и Јужноафричке Републике утврђено је да су јужноафрички сојеви много патогенији (Ноорег и сар., 1996). Серотип 8 вируса узрочника катаралне грознице оваца је показао релативно ниску вируленцију код инфицираних животиња у Израелу (Brenner и сар., 2010), док је исти серотип изазвао у северној Европи током 2006. године висок mortalitet код оваца. Серотип BTV-24 се показао слабо вирулентним у САД, док је у Израелу изазвао висок морбидитет у погођеним стадима (Brenner и сар., 2010; MacLachlan, 2010a). Након једнократних пасажа италијанског соја вируса BTV-2 и северноевропског соја BTV-8 на КС хелијама и двократних пасажа на ВНК-21 хелијама установљен је сличан степен вируленције код оба серотипа. Међутим, утврђена је значајна разлика у вируленцији између италијанског соја BTV-8 и холандског соја истог серотипа при чему је овај други био много вирулентнији (Caronale и сар., 2014).

Све у свему, инфекција узрокована серотипом 4 вируса катаралне грознице у региону југоисточне Европе остаће упамћена по апроксимативно 110.000 случајева клинички манифестне болести код разних пријемчивих врста са преко 40.000 угинућа (ОИЕ, 2014, 2015).

Методe потврђивања серотипа и секвенцирања сегмента 2 генома вируса узрочника епидемије катаралне грознице оваца у Црној Гори која је избила у задњем кварталу 2014. године су спроведене у лабораторији у Пирбрајту при чему је потврђено да се ради о серотипу 4 који је изазвао епидемије и у осталим земљама југоисточне Европе. Крајем маја 2014. године случај катаралне грознице оваца је клинички дијагностикован у Грчкој-јужни Пелопонез, преко 400 км даље од претходно најближег дијагностикованог случаја болести. Клиничка дијагноза је потврђена у лабораторији употребом компетитивног ELISA теста rt-RT-PCR. До краја јуна болест се проширила на цели Пелопонез, а до краја августа на целу земљу (ОИЕ, 2014). Друга земља у региону која је објавила присуство болести у јулу месецу 2014. била је Бугарска (ОИЕ, 2014), да би потом о присуству болести

на својим територијама у периоду од августа до децембра 2014. године известиле Албанија, Хрватска, Македонија, Мађарска, Црна Гора, Румунија, Србија и Турска (Niedbalski, 2015).

Изолат из Црне Горе је увршћен у колекцију референтних сојева (Orbivirus Reference collection at Pirbright) под бројем [MNT2014/01]. Анализе су показале да изолат из Црне Горе припада западном топотипу ВТВ-4 (Western topotype of ВТВ-4) пошто Сегмент-2 MNT2014/01 дели сличност са другим сојевима ВТВ-4 из Судана, Португалије, Шпаније, Корзике, Сардиније и Италије (са 95.5% - 94.1% истоветних нуклеотидних секвенци). Међутим, сегмент-2 MNT2014/01 је различит у поређењу са оним из ранијих изолата серотипа 4 пореклом из Грчке, Турске, Кипра и Израела, а који су изоловани у периоду од 1978. до 2012. године, као и од ВТВ-4 референтног соја RSArrr/04 из базе података (http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/ReoID/btv4.htm), који води порекло од ASOT1 соја изолованог на Кипру 1969. године (Parker и сар., 1975).

Секвенца сегмента-2 из MNT2014/01 је најсроднија са секвенцом Сегмента-2 ВТВ-4 изолата GRE2014/01 (јужна Грчка- регион Пелепоноза) показујући 99.9% нуклеотидне сличности и 100% нуклеотидне сличности са Сегментом-2 изолата BUL2014/18, BUL2014/07 (Бугарска), KOS2014/01 (Косово), SER2014/01 (Србија) и HUN2014/01 (Мађарска). Ово показује да је Сегмент-2 међу изолатима MNT2014/01, HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01 готово идентичан што указује на њихово заједничко порекло. Овакав степен истоветности би се могао очекивати за изолате из појединачних епидемија.

Реасортирање генома вируса катаралне грознице се редовно јавља како на терену тако и у експерименталним условима, а резултира значајним променама у степену вируленције (Batten и сар., 2008b; Celma и сар., 2014; Coetzee и сар., 2014; Shaw и сар., 2013). Реасортиман између серотипова може обухватити појединачне односно мултипле сегменте дајући тако многобројне могуће варијанте (Shaw и сар., 2013). Генетски реасортиман је појава распрострањена у целом свету и сноси одговорност за генетску разноврсност европских сојева вируса катаралне грознице. Показало се да су бар четири вакцинална јужноафричка соја била укључена у процесу реасортирања последњих година (Nomikou и сар., 2015).

Секвенцирањем сегмента 2 генома и филогенетским компарацијама доказано је да су изолати из Грчке и Бугарске сродни 99,9% (Mertens и сар., 2014). Такође је утврђена сродност у оквиру серотипа 4 са сојевима изолованим у Судану 1983 (94,2-95,7% нуклеотидне сродности) (Mertens и сар., 2014). У сегменту 4 вирусног генома утврђена је сродност са два соја серотипа 2 изолована у Тунису и Италији (98,8 % нуклеотидне сличности). На основу доступних информација верује се да је сој који је узроковао епидемију у Грчкој реасортирани сој са сегментима генома од сојева серотипова 1, 2 и 4 (Mertens и сар., 2014). Иначе, реасортиман генома вируса катаралне грознице оваца је честа појава (Roberts и сар., 2014).

Геном сегмента-2 MNT2014/01 показује мањи степен сродства (72.8% нуклеотидне сличности/72.4% нуклеотидне сличности) са сојевима источног топотипа BTV-4 из Кине (приступни број JX560414) и из Индије (приступни број KF560418).

Изолат MNT2014/01 (заједно са HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01) представља нову интродукцију „западног топотипа“ BTV-4 у источно медитеранску и балканску регију Европе (Црна Гора, Мађарска, Србија, Косово, Бугарска и Грчка). Висок степен подударности Сегмента-2 MNT2014/01, HUN2014/01, SER2014/01, KOS2014/01, BUL2014/18, BUL2014/07 и GRE2014/01 указује да је у сваком случају Сегмент-2 дошао из истог извора за све наведене вирусне изолате без обзира што су пореклом из различитих земаља.

Обдукциони налаз је био прилично уједначен код свих двадесет обдукованих оваца које су са подручја различитих општина (Подгорица, Улцињ и Херцег Нови). Промене су се углавном разликовале само по степену изражености и одговарале су променама које су описали разни аутори у својим радовима (Spreull, 1905; Erasmus, 1975; Tweedle и Mellor, 2002). Најистакнутије разлике међу обдукованим овцама су биле у вези са раније поменутиим променама на глави. Код свега две од двадесет оваца промене на језику су биле изражене што је у сагласности са подацима из литературе (Tweedle и Mellor, 2002) који истичу да цијанотичан и отечен језик није тако чест налаз. Ерозије на језику и слузници усне дупље нађене су само код једне овце. На основу литературних података разних

аутора (Tweedle и Mellor, 2002; Darpel и сар., 2007; Mauroy и сар., 2008; MacLachlan и сар., 2009) који су, између осталог, у својим радовима акценат стављали на патогенезу, патоморфолошке и патохистолошке промене, код катаралне грознице оваца се јављају поткожни желатинозни едеми на глави, хеморагије у мишићном слоју пулмоналне артерије и аорте, хиперемија, а повремено и цијаноза оралне мукозе са петехијама и екхимозама. Ерозије са некротичним ткивом могу да се појаве на уснама језику и образима. Хиперемија и крварења у румену и ретикулуму су чест налаз. Лимфни чворови, тонзиле и слезина су увећани и хеморагични. Крварења се могу наћи на корену језика, перикарду, бубрезима, цревима нарочито на илеоцекалном споју и поткожном ткиву. На скелетној и срчаној мускулатури се могу понекад запазити мала некротична поља. Уз то, могу се јавити и запаљенски процеси у горњим партијама респираторног тракта, плућни едем, пенушави садржај у трахеји и бронхусима, плеуритис, перикардитис са накупљањем течности у перикардијалној дупљи и ентеритис.

Крварења на бази пулмоналне артерије и некрозе на папиларним мишићима леве коморе се сматрају патогномоничним променама, мада не морају увек да буду присутни.

Хистолошке промене укључују хипертрофију капиларног ендотела, периваскуларне едеме и инфилтрацију скелетне и срчане мускулатуре макрофагима и лимфоцитима, васкуларну конгестију са следственим ткивним инфарктима који узрокују хипоксију ткива и ћелијску десквамацију. У акутним случајевима скелетна и срчана мускулатура су често захваћене некротичним процесима, који у хроничним случајевима резултирају моноклеарном ћелијском инфилтрацијом и фиброзом (Brodie и сар., 1998; Tweedle и Mellor, 2002; MacLachlan и сар., 2009).

У испитиваном материјалу приликом скидања коже у поткожном ткиву су нађена интензивна крварења која су варирала од блаже изражених до интензивно изражених крвних подлива. Мање или веће хеморагије су евидентирани и на скелетним мишићима, али нису нађени некротични процеси. У трбушној и грудној дупљи код свих обдукованих оваца утврђено је присуство мање или веће количине течности чији се карактер мењао од серозне до хеморагичне. На нивоу дигестивног тракта хиперемија и крварења су били интензивно изражени на преджелуцима,

првенствено бурагу и ретикулуму, на листовцу ређе. Нађена је јака хиперемиа мезентеријалних крвних судова, увећани мезентеријални лимфни чворови са интензивним крварењима због чега су тамни, готово црне боје. Не само мезентеријални, него и већина других лимфних чворова је била погођена интензивним крварењима услед којих су на пресеку боје труле вишње или црне боје, често у потпуности испуњени крвљу. Промене нађене на другим лимфоидним органима су сличне променама у лимфним чворовима. Заправо, мање или више увећана слезина са субкапсуларним крварењима је лако уочљив налаз, као и крварења по тимусу. Хистолошки су на лимфоидним органима запажени периваскуларни едеми и веома интензивне хеморагичне инфилтрације лимфоидног ткива са израженом деплецијом. На појединим сегментима танког и дебелог црева нађена су крварења која су често захватала све слојеве цревног зида. На неким местима због интензивних крварења цревни зид је био таман, готово црне боје. Све обдуковане овце су имале промене на бубрезима са јако израженом хеморагичном компонентом. Тамни бубрези, боје труле вишње, због јаке хиперемие и хеморагичних инфилтрација су били јако карактеристичан налаз. Плућни едем, јако изражен и лако уочљив код свих обдукованих оваца је такође био карактеристичан налаз. Промене на нивоу респираторног тракта описане у радовима разних аутора (Tweedle и Mellor, 2002; Darpel и сар., 2007; Mauroy и сар., 2008; MacLachlan и сар., 2009) у потпуности одговарају променама нађеним у току нашег испитивања. Хеморагично пенушави садржај у бронхијама, трахеји и самим плућима, што се види на пресеку плућног ткива, је нађен код свих оваца, код једне се развила гангренозна пнеумонија као последица аспирације садржаја дигестивног тракта. Darpel и сар. (2012) истичу да једини орган где се хистолошки уочена оштећења не рефлектују на ниво анатомских промена и клиничку дисфункцију јесу плућа. Хистолошки се запажа лимитиран ниво смрти ендотелних ћелија, периваскуларни и перибронхијални едеми. Међутим, увећани интерстицијални притисак може “померити” едем у оближње зоне са нижим притиском као што су алвеоле и телесна дупља, па се течност постепено губи што има за последицу да плућни едем буде веома благ и хистолошки неупадљив. Такође, индиректна васкуларна оштећења настала посредством инфламаторних медијатора би могла играти важну

улогу у настанку разлика између озбиљног анатомског и клиничког плућног едема и ограниченог оштећења ендотелних ћелија које се детектује хистолошки. Током испитивања, хистолошки у промењеним плућима уочен је умерен плућни едем како интерстицијални тако и интраалвеоларни. Поред тога, плућна хиперимија и интензивне хеморагичне инфилтрације плућног ткива су оно што доминира у патохистолошком налазу плућа.

Године 1905., Spreull у својим радовима, а касније и Erasmus (1975) и остали аутори (Moulton, 1961; Gard, 1985) истичу налаз некрозе папиларних мишића у зиду леве коморе и крварења на бази пулмоналне артерије као патогномоничне налазе. У нашим испитивањима, нађена су крварења на корену пулмоналне артерије која су била лако уочљива и врло интензивна. Некрозе папиларних мишића нису нађене, али јесу ендокардијална и епикардијална крварења као и крварења на срчаним залисцима. У перикардијалној шупљини свих обдукованих оваца је нађена већа количина углавном хеморагичне течности. Хистолошким прегледом у срцу су нађени едем, хиперимија и местимични некротични процеси. Хистолошким прегледом промењеног језика запажен је едем, местимична некроза мишићних влакана и крварења. У једњаку је хистолошки уочена хиперимија крвних судова у крзну и местимичне хеморагичне инфилтрације у крзну и мишићној ламини слузнице. Хиперимија и хеморагичне инфилтрације паренхима су хистолошки детектоване у јетри. Мало је литературних података који описују промене на јетри код катаралне грознице оваца. Јако изражену хиперимију у јетри код угинуле женке алпаке у Немачкој у свом раду, између осталог, износе аутори (Henrich и сар., 2007).

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу постављене хипотезе и добијених резултата, може се закључити да:

1. се клиничка слика катаралне грознице оваца се испољила код инфицираних оваца, говеда и коза,
2. се катарална грозница оваца појавила при крају сезоне активности вектора, што је условило да се не прошири на северни део земље,
3. је вирус узроковао морбидитет оваца (4,1%) и говеда (27,6%), морталитет оваца (1,8) и говеда (2,8%), леталитет оваца (45%) и говеда (10,1%). Код коза морталитета није било,
4. су у испитиваном материјалу утврђене патоморфолошке промене које се јављају код катаралне грознице оваца: цијанотичан и отечен језик са протрузијом и улцерацијама на слузници језика и усне дупље, крварења у поткожју и на мускулатури, хиперемија мезентеријалних крвних судова и крварења на самом мезентеријуму и припадајућем масном ткиву, мезентеријални лимфни чворови су хипертрофични и хеморагични, на сегментима танког и дебелог црева крварења, субкапсуларна крварења на слезини, бубрези са јако израженом хиперемијом и крварењима, у ждрелу, трахеји и плућима хиперемија, едем и крварења, затим хемоперикардијум, ендокардијалне хеморагије, хеморагије на срчаним залисцима, локална папиларна некроза као и крварења на бази пулмоналне артерије,
5. у патохистолошкој слици доминирају интензивне хеморагичне инфилтрације промењених органа, местимичне некрозе у срчаном мишићу и језику, интерстицијални и интраалвеоларни плућни едем, хиперемија и интензивне хеморагичне инфилтрације плућног ткива, едем језика са местимичном некрозом мишићних влакана и крварења, хиперемија и хеморагичне инфилтрације јетриног паренхима, хиперемија и хеморагичне инфилтрације ткива слезине са хипоцелуларним лимфоидним фоликулима слезине, хеморагични екстравазати инфилтрирани у просторе између бубрежних каналића и гломерула, као и лимфоцитна деплеција у лимфним чворовима, слезини и тимусу,

6. је ланчаном реакцијом полимеразе помоћу Pan-BTV-S5 rRT-PCR доказано присуство секвенце вирусне РНК у испитиваном материјалу, а потом конвенционалном PCR методом уз употребу One step PCR кита и уз коришћење два пара прајмера за серотип BTV-4 доказано је да се ради о серотипу 4 што је и потврђено у лабораторији у Пирбрајту,
7. је секвенцирањем и филогенетском анализом изолата [MNT2014/01], који је увршћен у колекцију референтних сојева доказано да припада западном топотипу BTV-4 и да је најсроднији са изолатима из Бугарске, Србије, Мађарске и Грчке.
8. су серолошка испитивања говеда и оваца на катаралну грозницу показала већи број серопозитивних говеда у односу на број серопозитивних оваца. Код серопозитивних животиња су ретко уочени клинички симптоми болести што је указивало на слабу вирулентност узрочника,
9. је утврђено да је серотип BTV-4 узроковао обољење у Црној Гори као и у већини земаља Балканског полуострва током летњих и јесењих месеци 2014. године.
10. ће уочене и описане патоморфолошке и патохистолошке промене код животиња заражених са вирусом караталне грознице омогућити теренским ветеринарима лакше препознавање клиничких симптома и скратити дијагностички поступак.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Afshar A. (1994): Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 17:221–242.
2. Agren E.C.C., Burgin L., Sternberg Leverin S., Gloster J., Elvander M. (2010): Possible means of introduction of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) to Sweden in August 2008: comparison to results from two models for atmospheric transport of *Culicoides* vector. *Veterinary Record* 167, 484–488. Akira, S., 2006. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311:1–16.
3. Aleksandrowicz P., Wolf K., Falzarano D., Feldmann H., Seebach J., Schnittler H. (2008): Viral haemorrhagic fever and vascular alterations. *Hämostaseologie*. 28:77–84.
4. Anderson G.A., Scott J.L., Gershwin L.J., Osburn B.I. (1987): Identification of bluetongue virus specific immunoglobulin E in cattle. *Journal of General Virology*. 68:2509–2514.
5. Andrejeva J., Childs K.S., et al., (2004): The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (49):17264–17269.
6. OIE (2004): Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Chapter 2.1.9. Bluetongue, Office International Des Epizooties, Paris. http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00032.htm (accessed June 29, 2011)
7. Anonimno (2007): Scientific Report of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on request from the Commission (EFSA-Q-2006-311) and EFSA Self-mandate (EFSA-Q-2007-063) on bluetongue. *EFSA Journal* 479, 1–29; 480, 1–20.
8. Anonimno (2009b): Bluetongue, Norway (Immediate notification: 20/02 2009), RefOIE:7815. Anonymous http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=7815 (accessed March 20, 2011).
9. Anthony S, Jones H, Darpel KE, Elliott H, Maan S, Samuel A, Mellor PS, Mertens PP (2007): A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of Virological Methods* 141, 188–197.
10. Backx A, Heutink R, van Rooij E, van Rijn P (2009): Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Veterinary Microbiology* 138, 235–243.
11. Baldet T, Delecolle JC, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Meiswinkel R, Gerbier G (2008): Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 84–97.
12. Bansal, O.B., Stokes, A., Bansal, A., Bishop, D., Roy, P., 1998. Membrane organization of bluetongue virus nonstructural glycoprotein NS3. *J. Virol.* 72, 3362–3369.

13. Barratt-Boyes SM, Rossitto PV, Stott JL, MacLachlan NJ (1992): Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. *Journal of General Virology* 73, 1953–1960.
14. Barratt-Boyes, S.M., MacLachlan, N.J., 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol* 40, 361-371.
15. Barratt-Boyes S, MacLachlan NJ (1995): Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206, 1322–1329.
16. Bartsch S, Bauer B, Wiemann A, Clausen P-H, Steuber S (2009): Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research* 105, 373–380.
17. Batten, C.A., Maan, S., Shaw, A.E., Maan, N.S., Mertens, P.P., 2008b. A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res* 137, 56-63.
18. Batten, C. A., Henstock, M. R., Bin-Tarif, A., Steedman, H. M., Waddington, S., Edwards, L. & Oura, C. A., (2012). Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. *Vet Microbiol* 157, 119-124.
19. Baylis M, Mellor PS (2001): Bluetongue around the Mediterranean in 2001. *Veterinary Record* 149, 659.
20. Baylis, M., O'Connell, L., Mellor, P.S., 2008. Rates of bluetongue virus transmission between *Culicoides sonorensis* and sheep. *Med Vet Entomol* 22, 228-237.
21. Beaton, A.R., Rodriguez, J., Reddy, Y.K., Roy, P., 2002. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13154–13159.
22. Bekker, J.G., De Kock, G.W., Quinlan, J.B., 1934. The occurrence and identification of Bluetongue in cattle - the so-called Pseudo-Foot and Mouth Disease in South Africa. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 2, 393-449.
23. Belyaev AS, Roy P (1993): Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucleic Acids Research* 21, 1219–1223.
24. Bhanuprakash V, Indrani BK, Hosamani M, Balamurugan V, Singh RK (2009): Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert Reviews Vaccines* 8, 191–204.
25. Bhattacharya, B., Noad, R.J., Roy, P., 2007. Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virology* 367, 4–7.
26. Bhattacharya, B., Roy, P., 2008. Bluetongue virus outer capsid protein VP5 interacts with membrane lipid rafts via a SNARE domain. *J. Virol.* 82, 10600–10612.
27. Bhattacharya, B., Roy, P., 2013. Cellular phosphoinositides and the maturation of bluetongue virus, a non-enveloped capsid virus. *Virology* 453, 69–73.
28. Bhattacharya, B., Roy, P., 2010. Role of lipids on entry and exit of bluetongue virus, a complex non-enveloped virus. *Viruses* 2, 1218–1235.

29. Bonneau, K.R., Mullens, B.A., MacLachlan, N.J., 2001. Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/NS3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep, cattle, and *Culicoides sonorensis*. *J Virol* 75, 8298-8305.
30. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ (2002): Duration of viremia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology* 88, 115–125.
31. Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I.A., Maclachlan, N.J., 2007. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 25, 672-678.
32. Borkent A (2005): The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt WH (ed.): *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. 113–126.
33. Bouwknecht C, van Rijn PA, Schipper JM, Holzel D, Boonstra J, Nijhof AM, van Rooij MA, Jongejan F (2010): Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology*, 52, 183–92.
34. Boyce, M., Wehrfritz, J., Noad, R., Roy, P., 2004. Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J Virol* 78, 3994-4002.
35. Boyce, M., Roy, P., 2007. Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. *Journal of Virology* 81: 2179-2186.
36. Boyce, M., Celma, C.C.P., Roy, P., 2012. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Viol. J.* 9, 178.
37. Breard E, Pozzi N, Sailleau C, Durand B, Catinot V, Sellem E, Dumont P, Guerin B, Zientara S (2007): Transient adverse effects of an attenuated bluetongue virus vaccine on the quality of ram semen. *Veterinary Record* 160, 431–435.
38. Brenner, J., Oura, C., Asis, I., Maan, S., Elad, D., Maan, N., Friedgut, O., Nomikou, K., Rotenberg, D., Bumbarov, V., Mertens, P., Yadin, H., Batten, C., 2010. Multiple serotypes of bluetongue virus in sheep and cattle, Israel. *Emerg Infect Dis* 16, 2003-2004.
39. Brewer AW, MacLachlan NJ (1994): The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Archives of Virology* 136, 287–298.
40. Brodie SJ, Wilson WC, O’Hearn PM, Muthui D, Diem K, Pearson LD (1998): The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription – In situ PCR. *Journal of Virology* 72, 5599–5609.
41. Brookes, S.M., Hyatt, A.D., Eaton, B.T., 1993. Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 3), 525–530.
42. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Del Rio R, Borrás D, Beldron FJ, Martínez A, Calvo AJ, Lucientes J (2010): Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology* 24, 169–175.

43. Calvo-Pinilla, E., Rodriguez-Calvo, T., Anguita, J., Sevilla, N., Ortego, J., 2009a. Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor. *PLoS One* 4, e5171.
44. Calvo-Pinilla, E., Rodriguez-Calvo, T., Sevilla, N., Ortego, J., 2009b. Heterologous prime boost vaccination with DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara protects IFNAR(-/-) mice against lethal bluetongue infection. *Vaccine* 28 (2), 437–445.
45. Calvo-Pinilla, E., Navasa, N., Anguita, J., Ortego, J., 2012. Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus. *PLoS ONE* 7, e34735.
46. Campbell JA, Pelham-Clinton EC (1960): A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh (B)* 67, 181–302.
47. Caporale, M., Wash, R., Pini, A., Savini, G., Franchi, P., Golder, M., Patterson-Kane, J., Mertens, P., Di Gialleonardo, L., Armillotta, G., Lelli, R., Kellam, P., Palmarini, M., 2011. Determinants of bluetongue virus virulence in murine models of disease. *J Virol* 85, 11479-11489.
48. Caporale V, Giovannini A (2010): Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 29, 573–591.
49. Caporale, M., Di Gialleonardo, L., Janowicz, A., Wilkie, G., Shaw, A., Savini, G., Van Rijn, P.A., Mertens, P., Di Ventura, M., Palmarini, M., 2014. Virus and host factors affecting the clinical outcome of bluetongue virus infection. *J Virol* 88, 10399-10411.
50. Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabro, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M., Mellor, P.S., 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec* 153, 71-74.
51. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS (2006): Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology* 43, 73–78.
52. Caroni, P., 2001. New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20, 4332–4336.
53. Carpenter S, Wilson A, Mellor PS (2009): *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology* 17, 172–178.
54. Carpi G, Holmes EC, Kitchen A (2010): The evolutionary dynamics of bluetongue virus. *Journal of Molecular Evolution* 70, 583–592.
55. Celma, C.C.P., Roy, P., 2011. Interaction of calpactin light chain (S100A10/p11) and a viral NS protein is essential for intracellular trafficking of nonenveloped bluetongue virus. *J. Virol.* 85, 4783–4791.
56. Celma, C.C., Boyce, M., van Rijn, P.A., Eschbaumer, M., Wernike, K., Hoffmann, B., Beer, M., Haegeman, A., De Clercq, K., Roy, P., 2013. Rapid generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep. *J Virol* 87, 9856-9864.
57. Chauveau, E., Doceul, V., Lara, E., Adam, M., Breard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Meyer, G., Schwartz-Cornil, I., Ruscanu, S., Charley, B.,

- Zientara, S., Vitour, D., 2012. Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *J Virol* 86, 11789-11799.
58. Chauveau, E., Doceul, V., Lara, E., Breard, E., Sailleau, C., Vidalain, P.O., Meurs, E.F., Dabo, S., Schwartz-Cornil, I., Zientara, S., Vitour, D., 2013. NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol* 87, 8241-8246.
 59. Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., 2002. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296, 539-541.
 60. Chiang, E.T., Persaud-Sawin, D.A., Kulkarni, S., Garcia, J.G., Imani, F., 2006. Bluetongue virus and double-stranded RNA increase human vascular permeability: role of p38 MAPK. *J Clin Immunol* 26, 406-416.
 61. Clavijo A, Heckert RA, Dulac GC, Afshar A (2000): Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods* 87, 13–23.
 62. Clavijo A, Sepulveda L, Riva J, Pessoa-Silva M, Tailor-Ruthes A, Lopez JW (2002): Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Veterinary Record* 151, 301–302.
 63. Coetzee, P., Stokstad, M., Venter, E.H., Myrmel, M., Van Vuuren, M., 2012a. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virol J* 9, 198.
 64. Coetzee P, Stokstad M, Myrmel M, Mutowembwa P, Loken T, Venter EH, Van Vuuren M. 2013. Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8. *Vet. J.* 197:335–341.
 65. Cowley JA, Gorman BM (1987): Genetic reassortments for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *Journal of Virology* 61, 2304–2306.
 66. Dal Pozzo, F., Saegerman, C., Thiry, E., 2009. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *Vet J* 182, 142-151.
 67. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, Bachanek-Bankowska K, Kgosana L, Bin-Tarif A, Carpenter S, Muller-Doblies UU, Takamatsu H-H, Mellor PS, Mertens PPC, Oura CAL (2007): Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Veterinary Record* 161, 253–261.
 68. Darpel, K.E., Monaghan, P., Simpson, J., Anthony, S.J., Veronesi, E., Brooks, H.W., Elliott, H., Brownlie, J., Takamatsu, H.H., Mellor, P.S., Mertens, P.P., 2012. Involvement of the skin during bluetongue virus infection and replication in the ruminant host. *Vet Res* 43, 40.
 69. Davies FG (1978): Bluetongue studies with sentinel cattle in Kenya. *Journal of Hygiene (London)* 80, 197–204.
 70. Deal, E.M., Lahl, K., et al., 2013. Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J. Clin. Invest.* 123 (6), 2464–2474.
 71. De Clercq K, Mertens P, De Leeuw I, Oura C, Houdart P, Potgieter AC, Maan S, Hooyberghs J, Batten C, Vandemeulebroucke E, Wright IM, Maan N, Riocreux F, Sanders A, Vanderstede Y, Nomikou K, Raemaekers M, Bin-Tarif A, Shaw A, Henstock M, Breard E, Dubois E, Gastaldi-Thierry C, Zientara S, Verheyden B,

- Vandenbussche F. (2009): Emergence of bluetongue serotypes in Europe, Part 2: The occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transboundary and Emerging Diseases* 56, 355–361.
72. DeMaula C.D., Bonneau K.R. & MacLachlan N.J. (2000). – Changes in outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Res.*, 67, 59-66.
 73. DeMaula, C.D., Jutila, M.A., et al., 2001. Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during Bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt 4), 787–794.
 74. DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., et al., 2002. The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of Bluetongue. *Virology* 296 (2), 330–337.
 75. Dercksen D, Groot Nibbelink N, Paauwe R, Backx A, van Rijn P, Vellema P (2007): First outbreak of bluetongue in goats in The Netherlands (in Dutch). *Tijdschrift Diergeneeskunde* 132, 786–790.
 76. Desmecht D, Vanden Bergh R, Sartelet A, Leclerc M, Mignot C, Misse F, Sudraud C, Berthemin S, Jolly S, Mousset B, Linden A, Coignoul F, Cassart D (2008): Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Veterinary Record* 163, 50–52.
 77. Di Paolo, G., Moskowitz, H.S., Gipson, K., Wenk, M.R., Voronov, S., Obayashi, M., Flavell, R., Fitzsimonds, R.M., Ryan, T.a., De Camilli, P., 2004. Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431, 415–422.
 78. Diprose, J.M., Grimes, J.M., Sutton, G.C., Burroughs, J.N., Meyer, A., Maan, S., Mertens, P.P., Stuart, D.I., 2002. The core of bluetongue virus binds double-stranded RNA. *J Virol* 76, 9533-9536.
 79. Doceul, V., Chauveau, E., Lara, E., Breard, E., Sailleau, C., Zientara, S., Vitour, D., 2014. Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J Virol* 88, 10792-10802.
 80. Domitrovic, T., Movahed, N., Bothner, B., Matsui, T., Wang, Q., Doerschuk, P.C., Johnson, J.E., 2013. Virus assembly and maturation: auto-regulation through allosteric molecular switches. *J. Mol. Biol.* 425, 1488–1496.
 81. Drew CP, Heller MC, Mayo C, Watson JL, MacLachlan NJ (2010a): Bluetongue virus infection activates bovine monocyte-derived macrophages and pulmonary artery endothelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136, 292–296.
 82. Ducheyne E, De Denken R, Becu S, Codina B, Nomikou K, Mangana O, Georgiev G, Purse BV, Hendrickx G (2007): Quantifying the wind dispersal of *Culicoides* species in Greece and Bulgaria. *Geospatial Health* 2, 177–189.
 83. Dunbar MR, Cunningham MW, Roof JC (1998): Seroprevalence of selected disease agents from free-ranging black bears in Florida. *Journal of Wildlife Disease* 34, 612–619.
 84. Dungu, B., Gerdes, T., Smit, T., 2004. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Vet Ital* 40, 616-622.

85. du Toit, P.J., 1944. Transmission of Blue-Tongue and Horse-Sickness by Culicoides. *Onderstepoort J Vet Res* 19, 7-16.
86. Eaton, B.T., Hyatt, A.D., White, J.R., 1988. Localization of the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology* 163, 527–537.
87. Eaton, B.T., Crameri, G.S., 1989. The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* 70 (Pt 12), 3347-3353.
88. Eisenacher, K., Steinberg, C., et al., 2008. The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity. *Immunobiology* 212 (9–10), 701–714.
89. Elbers ARW, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, van der Spek A, Mintiens K (2008a): Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 21–30.
90. Elbers ARW, Backx A, Mintiens K, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, van der Spek A (2008b): Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 31–40.
91. Elbers, A.R., Backx, A., Mintiens, K., Gerbier, G., Staubach, C., Hendrickx, G., van der Spek, A., 2008c. Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Prev Vet Med* 87, 31-40.
92. Elbers ARW, van der Spek AN, van Rijn PA (2009): Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands
93. Erasmus, B.J., 1975. Bluetongue in sheep and goats. *Aust Vet J* 51, 165-170.
94. Erasmus, B.J., 1985. The history of bluetongue. *Prog Clin Biol Res* 178, 7-12.
95. Erasmus BJ (1990): Bluetongue virus. In: Dinter Z., Morein B. (eds.): *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier, New York, USA. 227–237.
96. Eschbaumer, M., Hoffmann, B., König, P., Teifke, J.P., Gethmann, J.M., Conraths, F.J., Probst, C., Mettenleiter, T.C., Beer, M., 2009. Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* 27, 4169-4175.
97. Eschbaumer M, Wackerlin R, Rudolf M, Keller M, König P, Zemke J, Hoffmann B, Beer M. 2010. Infectious blood or culture-grown virus: a comparison of bluetongue virus challenge models. *Vet. Microbiol.* 146:150–154.
98. Eschbaumer M, Hoffmann B, Moss A, Savini G, Leone A, König P, Zemke J, Conraths F, Beer M (2010): Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe-German field data and experimental infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 143, 189–195.
99. Evermann JF (2008): Accidental introduction of viruses into companion animals by commercial vaccines. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practise*, 38, 919–929.

100. Feenstra, F., Rene, G.P. van Gennip, Mieke Marius-Veldhuis, Eline Verheij, Piet A. van Rijn, 2014. Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent bluetongue virus challenge. *Journal of General Virology* (2014), 95, 2019-2029.
101. Feenstra, F., Pap, J.S., van Rijn, P.A., 2015. Application of bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine for different serotypes by VP2 exchange or incorporation of chimeric VP2. *Vaccine* 33, 812-818.
102. Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.-H., Walker, C., Lanford, R.E., Lemon, S.M., 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496, 1-6.
103. Fillmore, G.C., Lin, H., Li, J.K., 2002. Localization of the single-stranded RNA-binding domains of bluetongue virus nonstructural protein NS2. *J. Virol.* 76, 499-506.
104. Forzan, M., Wirblich, C., Roy, P., 2004. A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2100-2105.
105. Forzan, M., Marsh, M., Roy, P., 2007. Bluetongue virus entry into cells. *J Virol* 81, 4819-4827.
106. Foster, N.M., Luedke, A.J., Parsonson, I.M., Walton, T.E., 1991. Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res* 52, 192-196.
107. Franceschi, V., Capocefalo, A., Calvo-Pinilla, E., Redaelli, M., Mucignat-Caretta, C., Mertens, P., Ortego, J., Donofrio, G., 2011. Immunization of knock-out alpha/beta interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTV-8 VP2 antigen. *Vaccine* 29 (16), 3074-3082.
108. Franchi, P., Mercante, M.T., Ronchi, G.F., Armillotta, G., Ulisse, S., Molini, U., Di Ventura, M., Lelli, R., Savini, G., Pini, A., 2008. Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus. *J Virol Methods* 153, 263-265.
109. French, T. J., Inumaru, S. And Roy. P. 1989. Expression of two related nonstructural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV infected BHK cells. *Journal of Virology* 63: 3270-3278.
110. Fu, H., Leake, C.J., Mertens, P.P., Mellor, P.S., 1999. The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Arch Virol* 144, 747-761.
111. Gale P, Drew T, Phipps LP, David G, Wooldridge M (2009): The effect of climate change on occurrence and prevalence of livestock diseases in Great Britain: a review. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1409-1423.
112. Gard, G.P. (1987): *Studies of Bluetongue Virulence and Pathogenesis in Sheep*. Technical Bulletin No.103 Darwin: Department of Industries and Development.
113. Ghalib, H.W., Cherrington, J.M., Osburn, B.I., 1985. Virological, clinical and serological responses of sheep infected with tissue culture adapted bluetongue virus serotypes 10, 11, 13 and 17. *Vet Microbiol* 10, 179-188.

114. Gibbs EPJ, Greiner EC (1994): The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology and Microbiology and Infectious Diseases* 17, 207–220.
115. Gibbs, E.P., Lawman, M.J., Herniman, K.A., 1979. Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep—a possible overwintering mechanism. *Res Vet Sci* 27, 118-120.
116. Goldsmit, L., Barzilai, E., Tadmor, A., 1975. Comparative Sensitivity of Sheep and Chicken Embryos to Bluetongue Virus and Observations on Viremia in Experimentally Infected Sheep. *Aus Vet J* 51, 190-196.
117. Goldsmit L, Barzilai E (1985): Isolation and propagation of bluetongue virus in embryonating chicken eggs. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn BI (eds.): *Bluetongue and Related Orbiviruses*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 307–318.
118. Gomez-Villamandos JC, Sanchez C, Carrasco L, Laviada MD, Bautista MJ, Martinez-Torrecedrera J, Sanchez-Vizcaino JM, Sierra MA: Pathogenesis of African horse sickness: ultrastructural study of the capillaries in experimental infection. *J Comp Pathol* 1999, 121:101–116.
119. Grimes, J.M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A.K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D.I., Prasad, B.V., 1997. An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Structure* 5, 885-893.
120. Grimes JM, Burroughs JN, Gouet P, Diprose JM, Malby R, Zientara S, Mertens PP, Stuart DI (1998): The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 395, 470–478.
121. Hamblin, C. (2004). Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques. *Vet. Ital.*, 40, 538-545.
122. Hamers, C., Rehbein, S., Hudelet, P., Blanchet, M., Lapostolle, B., Cariou, C., Duboeuf, M., Goutebroze, S., 2009. Protective duration of immunity of an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep. *Vaccine* 27, 2789-2793.
123. Hammoumi S, Breard E, Sailleau C, Russo P, Grillet C, Cetre-Sossah C, Albina E, Sanchis R, Pepin M, Guibert J-M, Zientara S (2003): Studies on the safety and immunogenicity of the South African bluetongue virus serotype 2 monovalent vaccines: specific detection of the vaccine strain genome by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medicine B* 50, 316–321.
124. Han Z, Harty RN (2004): The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *Journal of Biological Chemistry* 279, 43092–43097.
125. Hardy WT, Price DA (1952): Soremuzzle of sheep. *Journal of American Veterinary Medical Association* 120, 23–25.
126. Haresnape JM, Taylor WP, Lungu SAM (1989): The epidemiology of bluetongue in Malawi. *Epidemiology and Infection* 100, 493–499.
127. Hassan SS, Roy P (1999): Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *Journal of Virology* 73, 9832–9842.
128. Hassan, S.H., Wirblich, C., Forzan, M., Roy, P., 2001. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. *J Virol* 75, 8356-8367.

129. He, C.Q., Ding, N.Z., He, M., Li, S.N., Wang, X.M., He, H.B., Liu, X.F., Guo, H.S., 2010. Intragenic recombination as a mechanism of genetic diversity in bluetongue virus. *J Virol* 84, 11487-11495.
130. Helms, J.B., Zurzolo, C., 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247-254.
131. Hendrickx G (2009): The spread of blue tongue in Europe. *Small Ruminant Research* 86, 34-39.
132. Henrich, M., Reinacher M., Hamann HP (2007): Lethal bluetongue virus infection in an alpaca, *Veterinary Record*, 161:22764
133. Hervás-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., et al., 2011. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* 17 (9), 2619-2627.
134. Hocking B: Blood-sucking behavior of terrestrial arthropods. *Annu Rev Entomol* 1971, 16:1-26.
135. Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G., Thuer, B., 2008. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 14, 1855-1861.
136. Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Batza HJ, Beer M, Clausen PH, Geier M, Gethmann JM, Kiel E, Liebisch G, Liebisch A, Mehlhorn H, Schaub GA, Werner D, Conraths FJ (2009): Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1481-1484.
137. Hooper, P.T., Lunt, R.A., Stanislawek, W.L., 1996. A trial comparing the virulence of some South African and Australian bluetongue viruses. *Aust Vet J* 73, 36-37.
138. Hourrigan, J.L., Klingsporn, A.L., 1975b. Epizootiology of bluetongue: the situation in the United States of America. *Aust Vet J* 51, 203-208.
139. Howell, P.G., 1960. A preliminary antigenic classification of strains of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 28, 357-363.
140. Howell, P.G., Kumm, N.A., Botha, M.J., 1970. The application of improved techniques to the identification of strains of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 37, 59-66.
141. Howerth EW, Dorminy M, Dreesen DW, Spires EA, Stallknecht DA (1995): Low prevalence of antibodies to bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in dogs from southern Georgia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7, 393-394.
142. Howerth EW, Stallknecht DE, Kirkland PD (2001): Bluetongue, epizootic hemorrhagic disease, and other orbivirus related diseases. In: Williams ES, Barker IK (eds.): *Infectious diseases of wild mammals*. 3rd ed. Iowa State University Press, Iowa. 77-97.
143. Huber, J.P., Farrar, J.D., 2011. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* 132 (4), 466-474.
144. Huisman, H., 1969. Bluetongue virus-induced interferon synthesis. *Onderstepoort J Vet Res* 36, 181-185.
145. Huisman, H., Erasmus, B.J., 1981. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 48, 51-58.
146. Huisman, H., Els, H.J., 1979. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology* 92, 397-406.

147. Huismans, H., van der Walt, N.T., Cloete, M., Erasmus, B.J., 1987a. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. *Virology* 157, 172-179.
148. Hutcheon, D., 1881. Fever of epizootic catarrh. *Rept Coll Vet Surg*.
149. Hyatt, A.D., Eaton, B.T., Brookes, S.M., 1989. The release of bluetongue virus from infected cells and their superinfection by progeny virus. *Virology* 173, 21–34.
150. Inumaru S, Ghiasi H, Roy P (1987): Expression of bluetongue virus group-specific antigen VP3 in insect cells by a baculovirus vector: its use for detection of bluetongue virus antibodies. *Journal of General Virology* 68, 1627–1635.
151. Jabbar, T.K., Calvo-Pinilla, E., Mateos, F., Gubbins, S., Bin-Tarif, A., Bachanek-Bankowska, K., Alpar, O., Ortego, J., Takamatsu, H.H., Mertens, P.P., Castillo-Olivares, J., 2013. Protection of IFNAR(–/–) mice against bluetongue virus serotype 8, by heterologous (DNA/rMVA) and homologous (rMVA/rMVA) vaccination, expressing outer-capsid protein VP2. *PLoS ONE* 8, e60574.
152. Jameson, P., Schoenherr, C.K., Grossberg, S.E., 1978. Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice. *Infect Immun* 20, 321-323.
153. Janowicz, A., Caporale, M., Shaw, A., Gulletta, S., Di Gialleonardo, L., Ratnieri, M., Palmarini, M., 2015. Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8. *J Virol* 89, 5238-5249.
154. Jauniaux TP, De Clerq KE, Cassart DE, Kennedy S, Vandebussche FE, Vandemeulebroucke EL, Vanbinst TM, Verheyden BI, Goris NE, Coignoul FL (2008): Bluetongue in Eurasian Lynx. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1496–1498.
155. Jeggo, M.H., Gumm, I.D., Taylor, W.P., 1983. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Res Vet Sci* 34, 205-211.
156. Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Brownlie, J., 1984. A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* 52, 403–410.
157. Jeggo, M.J., Corteyn, A.H., Taylor, W.P., Davidson, W.L., Gorman, B.M., 1987. Virulence of bluetongue virus for British sheep. *Res Vet Sci* 42, 24-28.
158. Jenckel, M., Breard, E., Schulz, C., Sailleau, C., Viarouge, C., Hoffmann, B., Hoper, D., Beer, M., Zientara, S., 2015. Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. *Genom Annou* 3.
159. Jimenez-Clavero M.A., Agüero M., San M.E., Mayoral T., Lopez M.C., Ruano M.J., Romero E., Monaco F., Polci A., Savini G. & Gomez-Tejedor C. (2006) High throughput detection of bluetongue virus by a new real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction: application on clinical samples from current Mediterranean outbreaks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18, 7-17.
160. Jones, R.H., Foster, N.M., 1974. Oral infection of *Culicoides variipennis* with bluetongue virus: development of susceptible and resistant lines from a colony population. *J Med Entomol* 11, 316-323.
161. Kampen H, Werner D (2010): Three years of bluetongue disease in central Europe with special reference to Germany: what lessons can be learned? *Wiener Klinische Wochenschrift* 122, 31–39.

162. Kar, A.K., Ghosh, M., Roy, P., 2004. Mapping the assembly pathway of Bluetongue virus scaffolding protein VP3. *Virology* 324, 387-399.
163. Kar AK, Bhattacharya B, Roy P (2007): Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Molecular Biology* 8, 4.
164. Katz J, Alstad D, Gustafson G, Everman J (1994): Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected catcattle and experimentally infected sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 139–142.
165. Kawai, T., Akira, S., 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* 141 (2), 137–145.
166. Koumbati M, Mangana O, Nomikou K, Mellor PS, Papadopoulos O. 1999. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 64:277–285.
167. Kiefer, K., Oropallo, M.A., et al., 2012. Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol. Cell Biol.* 90 (5), 498–504.
168. Kirschvink N, Raes M, Saegerman C (2009): Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *Veterinary Journal* 182, 244–251.
169. Koumbati M, Mangana O, Nomikou K, Mellor PS, Papadopoulos O (1999): Duration of bluetongue viremia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 64, 277–285.
170. Kramps, J.A., van Maanen, K., Mars, M.H., Popma, J.K. and van Rijn, P.A. (2008)
171. Lager, I.A., 2004. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* 40, 89-93.
172. Lawman MJP: Observations on the pathogenesis of BTV infections in sheep: a thesis submitted in part fulfilment for the degree of Doctor of Philosophy, University of Surrey; 1979.
173. Lee, J.W., Roy, P., 1986. Nucleotide sequence of a cDNA clone of RNA segment 10 of bluetongue virus (serotype 10). *J. Gen. Virol.* 67, 2833–2837.
174. Lee, H.R., Kim, M.H., et al., 2009. Viral interferon regulatory factors. *J. Interferon Cytokine Res.* 29 (9), 621–627.
175. Lewerin SS, Hallgren G, Mieziewska K, Treiberg Berndtsson L, Chirico J, Elvander M (2010): Infection with bluetongue virus serotype 8 in Sweden in 2008. *Veterinary Record* 167, 165–170.
176. Lingwood, D., Simons, K., 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46–50.
177. Lobato ZI, Coupar BE, Gray CP, Lunt R, Andrew ME (1997): Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 59, 293–309.
178. Lopez WA, Nicoletti P, Gibbs EPJ (1985): Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production* 17, 82.

179. Losson B, Mignon B, Paternostre J, Madder M, De Deken R, De Deken G, Deblauwe I, Fassotte C, Cors R, Defrance T, Delecolle J-C, Baldet T, Hubruge E, Frederic F, Bortels J, Simonon G (2007): Biting midges overwintering in Belgium. *Veterinary Record* 160, 451–452.
180. Luedke AJ, Jones RH, Walton TE (1977): Overwintering mechanism for bluetongue virus: Biological recovery of latent virus from a bovine by bites of *Culicoides variipennis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26, 313–325.
181. Lunt RA, Melville L, Hunt N, Davis S, Rootes CL, Newberry KM, Pritchard LI, Middleton D, Bingham J, Daniels PW, Eaton BT (2006): Cultured skin fibroblast cells derived from bluetongue virus-inoculated sheep and field-infected cattle are not source of late and protracted recoverable virus. *Journal of General Virology* 87, 3661–3666.
182. Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I., Roy, P., 2003. Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA. *J. Biol. Chem.* 278, 31722–31730.
183. Lysyk TJ, Danyk T (2007): Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus. *Journal of Medical Entomology* 44, 741–751.
184. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N., 2012. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. *PLOS ONE* 7 (4), e34425.
185. Maan, S., Maan, N.S., Samuel, A.R., Rao, S., Attoui, H., Mertens, P.P., 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol* 88, 621-630.
186. Maan, S., Maan, N.S., Ross-smith, N., Batten, C.A., Shaw, A.E., Anthony, S.J., Samuel, A.R., Darpel, K.E., Veronesi, E., Oura, C.A., Singh, K.P., Nomikou, K., Potgieter, A.C., Attoui, H., van Rooij, E., van Rijn, P., De Clercq, K., Vandebussche, F., Zientara, S., Breard, E., Sailleau, C., Beer, M., Hoffman, B., Mellor, P.S., Mertens, P.P., 2008. Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology* 377, 308-318.
187. Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Veronesi, E., Bachanek-Bankowska, K., Belaganahalli, M.N., Attoui, H., Mertens, P.P., 2011. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS One* 6, e26147.
188. Maan, S., Maan, N.S., Belaganahalli, M.N., Kumar, A., Batra, K., Rao, P.P., Hemadri, D., Reddy, Y.N., Putty, K., Krishnajyothi, Y., Reddy, G.H., Singh, K.P., Hegde, N.R., Nomikou, K., Sreenivasulu, D., Mertens, P.P., 2015. Genome Sequence of Bluetongue Virus Type 2 from India: Evidence for Reassortment between Outer Capsid Protein Genes. *Genom Annou* 3.
189. MacLachlan NJ, Crafford JE, Vernau W, Gardner IA, Goddard A, Guthrie AJ, Venter EH. 2008. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet. Pathol.* 45:310–315.

190. MacLachlan NJ, Nunamaker RA, Katz JB, Sawyer MM, Akita GY, Osburn BI, Tabachnick WJ (1994): Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Archives of Virology* 136, 1–8.
191. MacLachlan, N.J., 2004. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet Ital* 40, 462-467.
192. MacLachlan, N.J., Schore, C.E., Osburn, B.I., 1984. Antiviral Responses of Bluetongue Virus- Inoculated Bovine Fetuses and Their Dams. *Am J Vet Res* 45, 1469-1473.
193. MacLachlan, N.J., Thompson, J., 1985. Bluetongue Virus-Induced Interferon in Cattle. *Am J Vet Res* 46, 1238-1241.
194. MacLachlan NJ, Heidner HW, Fuller FJ (1987): Humoral immune response of calves to bluetongue virus infection. *American Journal of Veterinary Research* 48, 1031–1035.
195. MacLachlan N.J., Osburn B.I. & Stott J.L. (1989). –Is bluetongue virus infection of cattle a truly persistent viral infection? *Proc. US Anim. Hlth Assoc.*, 94, 89-98.
196. MacLachlan NJ, Gard G (2009): Clinical signs and pathology. In: Mellor P, Baylis M, Mertens PPC (eds.): *Bluetongue*. Academic Press, London. 285–293.
197. MacLachlan, N.J., Jagels, G., Rossitto, P.V., Moore, P.F., Heidner, H.W., 1990. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet Pathol* 27, 223-229.
198. MacLachlan, N.J., 1994. The Pathogenesis and Immunology of Bluetongue Virus- Infection of Ruminants. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 17, 197- 206.
199. MacLachlan NJ, Conley AJ, Kennedy PC (2000): Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Animal Reproduction Science* 60–61, 643–651.
200. MacLachlan, N.J., 2010a. Global Implications of the Recent Emergence of Bluetongue Virus in Europe. *Vet Clin N Am Food Anim Practice* 26, 163-+.
201. MacLachlan, N.J., Drew, C.P., Darpel, K.E., Worwa, G., 2009. The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Comparative Pathology* 141, 1-16.
202. MacLachlan NJ (2010): Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise* 26, 163–171.
203. MacLachlan, N.J., Guthrie, A.J., 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Vet Res* 41.
204. Manso-Ribeiro, J., Noronha, FMO., 1958. Fievre catarrhale du mouton au Portugal (Blue Tongue). *Bull. Off. Int. Epizoot.* 50, 46-64
205. Martinez-Costas, J., Sutton, G., Ramadevi, N., Roy, P., 1998. Guanylyltransferase and RNA 5'- triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus. *J Mol Biol* 280, 859-866.
206. Matsuo, E., Roy, P., 2013. Minimum requirements for bluetongue virus primary replication in vivo. *J. Virol.* 87, 882–889.
207. Mauroy A, Guyot H, De Clercq K, Cassart D, Thiry E, Saegerman C (2008): Bluetongue in captive yaks. *Emerging Infectious Diseases* 14, 675–676.

208. Mcholland L.E. & Mecham J.O. (2003). Characterization of cell lines developed from field populations of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.*, 40, 348–351.
209. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Jahn B, Jaeger F, Eschweiler J, Hoffmann B, Beer M (2007): First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research* 101, 219–228.
210. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schaub G, Kiel E, Focke R, Liebisch G, Liebisch A, Werner D, Bauer C, Clausen H, Bauer B, Geier M, Horbrand T, Batza H-J, Conraths FJ, Hoffmann B, Beer M (2009): Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitology Research* 105, 313–319.
211. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schmahl G (2008): Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research* 103, 79–86.
212. Meiswinkel R, Nevill EM, Venter GJ (1994): Vectors: *Culicoides* spp. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC (eds.): *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Vol. 1. Oxford University Press, Cape Town. 68–89.
213. Meiswinkel R, Gomulski LM, Delecolle J-C, Goffredo M, Gasperi G (2004): The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. *Veterinaria Italiana* 40, 151–159.
214. Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M (2007): Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary Record* 161, 564–565.
215. Mellor PS, Pitzolis G (1979): Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research* 69, 229–234.
216. Mellor, P.S., 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 162, 143–161.
217. Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000): *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 45, 307–340.
218. Mellor PS, Boorman J (1995): The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89, 1–15.
219. Mellor, P.S. (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *J. Comp. Path.*, 123, 231–247.
220. Mellor PS, Wittmann EJ (2002): Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Veterinary Journal* 164, 20–37.
221. Mellor, P.S. (2004) Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Vet Ital.* 40, 167–74.
222. Mellor, P.S., Baylis, M., Mertens, P.P.C 2009. *Bluetongue*. (Elsevier, Academic Press, London.).
223. Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PP (2008): Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 4–20.

224. Melville LF, Hunt NT, Davis SS, Weir RP (2004): Bluetongue virus does not persist in naturally infected cattle. *Veterinaria Italiana* 40, 502–507.
225. Mertens, P.P., Brown, F., Sangar, D.V., 1984. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 135, 207-217.
226. Meng, B., Lever, A.M., 2013. Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. *Retrovirology* 10, 5.
227. Mertens, P.P., Burroughs, J.N., Walton, A., Wellby, M.P., Fu, H., O'Hara, R.S., Brookes, S.M., Mellor, P.S., 1996. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. *Virology* 217, 582-593.
228. Mertens, P.P., Diprose, J., 2004. The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus Res* 101, 29-43.
229. Mertens PPC, Maan S, Samuel A, Attoui H: Orbivirus, Reoviridae. In Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. London: Elsevier/Academic Press; 2005:466–483.
230. Mertens PPC, Pedley S, Cowley J, Burroughs JN, Corteyn AH, Jeggo MH, Jennings DM, Gorman BM (1989): Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* 170, 561–565.
231. Mertens, P., Batten, C., Nomikou, C., 2014. Bluetongue –Europe (15): Southeast Europe, serotype 4, genotype. Promed.
232. Mintiens K, Meroc E, Mellor PS, Staubach C, Gerbier G, Elbers ARW, Hendrickx G, De Clercq K (2008): Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 131–144.
233. Mo CL, Thompson LH, Homan EJ, Oviedo MT, Greiner EC, Gonzales J, Saenz MR (1994): Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. *American Journal of Veterinary Research* 55, 211–215.
234. Modrof, J., Lymperopoulos, K., Roy, P., 2005. Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J. Virol.* 79, 10023–10031.
235. Mohammed ME, Taylor WP (1987): Infection with bluetongue and related orbiviruses in the Sudan detected by the study of sentinel calf herds. *Epidemiology and Infection* 99, 533–545.
236. Monaghan P, Simpson J, Murphy C, Durand S, Quan M, Alexandersen S: Use of confocal immunofluorescence microscopy to localize viral nonstructural proteins and potential sites of replication in pigs experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 2005, 79:6410–6418.
237. Monaco, F., Bonfini, B., Zaghini, M., Antonucci, D., Pini, A., Savini, G., 2004. Vaccination of cattle using monovalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotype 2: innocuity, immunogenicity and effect on pregnancy. *Vet Ital* 40, 671-675.

238. Mortola E, Noad R, Roy P (2004): Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *Journal of Virology* 78, 2875–2883.
239. Moulton, J.E (1961): Pathology of bluetongue in sheep. *J. Am.Vet. Med. Assoc.* 138, 493-8
240. Mushi EZ, Hill FWG, Daweb P, Riess R (1990): Antibodies to bluetongue and African horse sickness viruses in the sera of elephants in Zimbabwe. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* 38, 475.
241. Nason EL, Rothagel R, Murkherjee SK, Kar AK, Forzan M, Prasad BV, Roy P (2004): Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *Journal of Virology* 78, 8059–8067.
242. Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., et al., 2002. Coordinated and distinct roles for IFN alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169 (8), 4279–4287.
243. Neidbalski, W., 2015. Bluetongue in Europe and the role of wildlife in the epidemiology of disease. *Polish J. Vet. Sci.* 18, 455-461.
244. Neitz, W.O., 1948. Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 23, 93-136.
245. Nevill EM, Venter GJ, Edwards M (1992): Potential Culicoides vectors of livestock orbiviruses in South Africa. In: Walton T, Osburn B (eds.): *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*. CRC Press, Boca Raton. 455–459.
246. Ninio C, Augot D, Delecolle J-C, Dufour B, Depaquit J (2011): Contribution to the knowledge of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitology Research* 108, 657–663.
247. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, Mordue Luntz AJ, Pierny SB (2007): Rapid diagnostic PCR assay for members of the Culicoides obsoletus and Culicoides pulicaris species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology* 124, 82–94.
248. Nomikou, K., Hughes, J., Wash, R., Kellam, P., Breard, E., Zientara, S., Palmarini, M., Biek, R., Mertens, P., 2015. Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. *PLoS Pathog* 11, e1005056.
249. OIE (2015) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.1.3. Bluetongue, pp 158-174.
250. Oldfield S, Adachi A, Urakawa T, Hirasawa T, Roy P (1990): Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology* 72, 449–451.
251. Orru G., Ferrando M.L., Meloni M., Liciardi M., Savini G. & De Santis P. (2006) Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *J. Virol. Methods*, 137, 34-42.
252. Osburn BI (1994): The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 17, 189–196.
253. Osburn, B.I., Johnson, R.T., Silverstein, A.M., Prendergast, R.A., Jochim, M.M., Levy, S.E., 1971a. Experimental viral-induced congenital encephalopathies. II.

- The pathogenesis of bluetongue vaccine virus infection in fetal lambs. *Lab Invest* 25, 206-210.
254. Osburn, B.I., Silverstein, A.M., Prendergast, R.A., Johnson, R.T., Parshall, C.J., Jr., 1971b. Experimental viral-induced congenital encephalopathies. I. Pathology of hydranencephaly and porencephaly caused by bluetongue vaccine virus. *Lab Invest* 25, 197-205.
 255. Owens, R.J., Limn, C., Roy, P., 2004. Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release. *J Virol* 78, 6649-6656.
 256. Parsonson IM (1990): Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *Current Topics of Microbiology and Immunology* 162, 119–141.
 257. Pascale, F., Contreras, V., et al., 2008. Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph. *J. Immunol.* 180 (9), 5963–5972.
 258. Perez-Cidoncha, M., Killip, M.J., Oliveros, J.C., Asensio, V.J., Fernandez, Y., Bengoechea, J.A., Randall, R.E., Ortin, J., 2014. An unbiased genetic screen reveals the polygenic nature of the influenza virus anti-interferon response. *J Virol* 88, 4632-4646.
 259. Pini A: Study on pathogenesis of bluetongue: replication of virus in organs of infected sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 1976, 43:159–164.
 260. Prasad BVV, Yamaguchi S, Roy P (1992a): Three-dimensional structure of single-shelled bluetongue virus. *Journal of Virology* 66, 2135–2142.
 261. Prasad G, Jain NC, Gupta Y (1992b): Bluetongue virus infection in India: a review. *Revue Scientifique et Technique* 11, 699–711.
 262. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology* 3, 171–181
 263. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007): *VETERINARY MEDICINE, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* Saunders Ltd., tenth edition
 264. Radostits OM, Blood DC, Gay CC (1994): *A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* 8th ed. VB Saunders Company Ltd. 1028–1033.
 265. Ramadevi, N., Burroughs, N.J., Mertens, P.P., Jones, I.M., Roy, P., 1998. Capping and methylation of mRNA by purified recombinant VP4 protein of bluetongue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13537-13542.
 266. Ramig RF: Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004, 78:10213–10220.
 267. Randolph SE, Rogers DJ (2010): The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nature Reviews Microbiology* 8, 361–371.
 268. Ratniner, M., Caporale, M., Golder, M., Franzoni, G., Allan, K., Nunes, S.F., Armezzani, A., Bayoumy, A., Rixon, F., Shaw, A., Palmarini, M., 2011. Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog* 7, e1002477.
 269. Rescher, U., Gerke, V., 2008. S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch.* 455, 575–582.
 270. Richards RG, MacLachlan NJ, Heidner HW, Fuller FJ (1988): Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10. *Veterinary Microbiology* 18, 233–242.

271. Rivera H, Madewell B, Ameghino E (1987): Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research* 48, 189–191.
272. Roberts, H., Smith, J., Batten, C., Nomikou, K., Mertens, P., 2014. Bluetongue virus (BTV-49) in Greece, Bulgaria and the Republic of Macedonia. Department for Environment, Food and Rural Affairs, United Kingdom.
273. Rodriguez-Sanchez B, Iglesias-Martin I, Martinez-Aviles M, Sanchez-Vizcaino JM (2008): Orbiviruses in the Mediterranean Basin: updated epidemiological situation of bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. *Transboundary and Emerging Diseases* 55, 205–214.
274. Rosadio RH, Evermann JF, Demartini JC (1984): A preliminary serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin B* 46, 157–161.
275. Roy, P., 1989. Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res.* 13, 179–206.
276. Roy P, Noad R (2006): Bluetongue virus assembly and morphogenesis. In: Roy P (ed.): *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg. 87–116.
277. Roy P (1992): Bluetongue virus proteins. *Journal of General Virology* 73, 3051–3064.
278. Roy P (2008): Functional mapping of bluetongue virus proteins and their interactions with host proteins during virus replication. *Cell Biochemistry and Biophysics* 50, 143–157.
279. Roy, P., Boyce, M., Noad, R., 2009. Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nat Rev Microbiol* 7, 120–128.
280. Ruscanu, S., Pascale, F., Bourge, M., Hemati, B., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H., Hope, J., Mertens, P., Meyer, G., Stewart, M., Roy, P., Meurs, E.F., Dabo, S., Zientara, S., Breard, E., Sailleau, C., Chauveau, E., Vitour, D., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., 2012. The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MYD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway. *J Virol* 86, 5817–5828.
281. Ruscanu, S., Jouneau, L., et al., 2013. Dendritic cell subtypes from lymph nodes and blood show contrasted gene expression programs upon Bluetongue virus infection. *J. Virol.* 87 (16), 9333–9343.
282. Saegerman, C., Reviriego-Gordejo, F., Pastoret, P.P. (2008): Bluetongue in northern Europe. World Organisation for Animal Health (OIE). Paris
283. Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, Raes M, Wiggers L, de Leeuw I, Vandenbussche F, Zimmer JY, Haubruge E, Cassart D (2011): The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype 8 infection on reproductive performance in sheep. *Veterinary Journal* 187, 72–80.
284. Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS (2008): Bluetongue epidemiology in the European union. *Emerging Infectious Diseases* 14, 539–544.
285. Santman-Berends, I.M., Hage, J.J., van Rijn, P.A., Stegeman, J.A., van Schaik, G., 2010a. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of

- Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology* 74, 1377-1384.
286. Santman-Berends, I.M., van Wuijckhuise, L., Vellema, P., van Rijn, P.A., 2010b. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. *Vet Microbiol* 141, 31-35.
 287. Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M.A., Baldi, L., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V., 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (Culicoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec* 157, 133-139.
 288. Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V., 2004. The isolation of bluetongue virus from field populations of the *Obsoletus* Complex in central Italy. *Vet Ital* 40, 286-291.
 289. Savini, G., Ronchi, G.F., Leone, A., Ciarelli, A., Migliaccio, P., Franchi, P., Mercante, M.T., Pini, A., 2007. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Vet Microbiol* 124, 140-146.
 290. Savini G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, Zientara S (2008): Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31, 101–120.
 291. Savini G, Hamers C, Conte A, Migliaccio P, Bonfini B, Teodori L, Di Ventura M, Hudelet P, Schumacher C, Caporale V (2009): Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Veterinary Microbiology* 133, 1–8.
 292. Savini, G., Cannas, A., Casaccia, C., Di Gialleonardo, L., Leone, A., Patta, C., Nicolussi, P., 2010. Risk factors associated with the occurrence of undesired effects in sheep and goats after field vaccination with modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2, 4 and 16. *Vet Microbiol* 146, 44-50.
 293. Schmahl G, Klimpel S, Walldorf V, Al-Quraishy S, Schumacher B, Jatzlau A, Mehlhorn H (2009a): Pilot study on deltamethrin treatment (Butox, Versatrine) of cattle and sheep against midges. *Parasitology Research* 104, 809–813.
 294. Schmahl G, Mehlhorn H, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid K, Schumacher B, Jatzlau A, Pohle H (2009b): Does rain reduce the efficacy of Butox 7.5 pour on (deltamethrin) against biting midges (*Culicoides* specimens)? *Parasitology Research* 105, 1763–1765.
 295. Schnettler, E., Ratniner, M., Watson, M., Shaw, A.E., McFarlane, M., Varela, M., Elliott, R.M., Palmarini, M., Kohl, A., 2013. RNA interference targets arbovirus replication in *Culicoides* cells. *J Virol* 87, 2441-2454.
 296. Schultz, G., Delay, P.D., 1955. Losses in newborn lambs associated with bluetongue vaccination of pregnancy ewes. *J Am Vet Med Assoc* 127, 224-226.
 297. Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P.C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S., 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 39.
 298. Sealfon, R.S., Lin, M.F., Jungreis, I., Wolf, M.Y., Kellis, M., Sabeti, P.C., 2015. FRESCo: finding regions of excess synonymous constraint in diverse viruses. *Gen biolog* 16, 38.
 299. Sellers, R.F., 1975. Bluetongue in Cyprus. *Aust Vet J* 51, 198-203.

300. Sellers RF, Taylor WP (1980): Epidemiology of bluetongue and the import and export of livestock, semen and embryos. *Bulletin of Office international des Epizooties* 92, 587–592.
301. Sellers, R.F., 1984. Bluetongue in Africa, the Mediterranean Region and near-East - Disease, Virus and Vectors. *Prev Vet Med* 2, 371-378.
302. Shad, G., Wilson, W.C., Mecham, J.O. and Evermann, J.F. (1997) Bluetongue virus detection: a safer reverse-transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viraemia in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 118–24.
303. Shaw, A.E., Monaghan, P., Alpar, H.O., Anthony, S., Darpel, K.E., Batten, C.A., Guercio, A., Alimena, G., Vitale, M., Bankowska, K., Carpenter, S., Jones, H., Oura, C.A., King, D.P., Elliott, H., Mellor, P.S. and Mertens, P.P.C. (2007) Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J. Virol. Methods* 145, 115–26.
304. Shaw, A.E., Ratnier, M., Nunes, S.F., Nomikou, K., Caporale, M., Golder, M., Allan, K., Hamers, C., Hudelet, P., Zientara, S., Breard, E., Mertens, P., Palmarini, M., 2013. Reassortment between two serologically unrelated bluetongue virus strains is flexible and can involve any genome segment. *J Virol* 87, 543-557.
305. Shimshony A (2004): Bluetongue in Israel – a brief historical overview. *Veterinaria Italiana* 40, 116–118.
306. Spreull, J., 1905. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J Comp Path Ther* 18, 321-339.
307. Stauber, N., Martinez-Costas, J., Sutton, G., Monastyrskaya, K., Roy, P., 1997. Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J Virol* 71, 7220-7226.
308. Stephan A, Clausen P-H, Bauer B, Steuber S (2009): PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vector of bluetongue in Germany. *Parasitology Research* 105, 367–371
309. Stewart, M., Dovas, C.I., Chatzinasiou, E., Athmaram, T.N., Papanastassopoulou, M., Papadopoulos, O., Roy, P., 2012. Protective efficacy of Bluetongue virus-like and subvirus-like particles in sheep: presence of the serotype-specific VP2, independent of its geographic lineage, is essential for protection. *Vaccine* 30, 2131-2139.
310. Stewart, M., Dubois, E., Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Thiery, R., Zientara, S., Roy, P., 2013. Bluetongue virus serotype 8 virus-like particles protect sheep *References* 194 against virulent virus infection as a single or multi-serotype cocktail immunogen. *Vaccine* 31, 553-558.
311. Stott JL, Osburn BI, MacLachlan NJ (1983): Diagnosis of bluetongue virus infection in cattle: virus isolation or serology? *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 26, 301–318.
312. Stott JL, Osburn BI, Alexander L (1985): *Ornithodoros coriaceus* (pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. *American Journal of Veterinary Research* 46, 1197–1199.

313. Tabachnick WJ (1996): The genetics of *Culicoides variipennis* and the epidemiology of bluetongue disease in North America. *Annual Review of Entomology* 45, 20–40.
314. Tabachnick, W.J., 2004. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital* 40, 144-150.
315. Takamatsu, H., Jeggo, M.H., 1989. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* 66, 258–263.
316. Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P.C., Kirkham P.A., Burroughs J.N. & Parkhouse R.M.E. (2003). – A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *J. Gen. Virol.*, 84, 227-235.
317. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I: IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* 2004, 85:1801–1813.
318. Tamayo R, Schoebitz R, Alonso O, Wenzel J (1985): First report of bluetongue antibody in Chile. *Progress in Clinical and Biological Research* 178, 555–558.
319. Tan, B.H., Nason, E., Staeuber, N., Jiang, W., Monastyrskaya, K., Roy, P., 2001. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J Virol* 75, 3937-3947.
320. Tanaka, S., Mikhailov, M., Roy, P., 1995. Synthesis of bluetongue virus chimeric VP3 molecules and their interactions with VP7 protein to assemble into virus core-like particles. *Virology* 214, 593-601.
321. Taylor, K.E., Mossman, K.L., 2012. Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology*.
322. Theiler, A., 1908. The inoculation of sheep against bluetongue and the results in practice. *Vet J* 64, 600-607.
323. Thiry E, Saegerman C, Guyot H, Kirten P, Losson B, Rollin F, Bodmer M, Czaplicki G, Toussaint J-F, De Clercq K, Dochy J-M, Dufey J, Gillemann J-L, Messemann K (2006): Bluetongue in northern Europe. *Veterinary Record* 159, 327.
324. Thomas, C.P., Booth, T.F., Roy, P., 1990. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *J. Gen. Virol.* 71, 2073–2083.
325. Tough, D.F., 2012. Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunol. Cell Biol.* 90 (5), 492–497.
326. Tweedle N, Mellor PS (2002): Technical review–bluetongue: The virus, hosts and vectors. Version 1.5. Report to the Department of Health, Social Services and Public Safety U.K. (DEFRA), 25 p. http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/documents/bluetongue_technical.PDF (accessed July 28, 2011).
327. Thomas FC (1984): Comparison of some storage and isolation methods to recover bluetongue virus from bovine blood. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 48, 108–110.

328. Unterholzner L., Bowie A.G. (2008): The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 75 (3), 589–602.
329. Van Dijk AA, Huismans H (1982): The effect of temperature on the in vitro transcriptase reaction of bluetongue virus, epizootic haemorrhagic disease virus and African horse sickness virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 49, 227–232.
330. van Gennip RG, van de Water SG, Maris-Veldhuis M, van Rijn PA. 2012. Bluetongue viruses based on modified-live vaccine serotype 6 with exchanged outer shell proteins confer full protection in sheep against virulent BTV8. *PLoS One* 7:e44619. 10.1371/journal.pone.0044619
331. van Schaik, G., Berends, I.M., van Langen, H., Elbers, A.R., Vellema, P., 2008. Seroprevalence of bluetongue serotype 8 in cattle in the Netherlands in spring 2007, and its consequences. *Vet Rec* 163, 441–444.
332. Vellema P (2008): Bluetongue in sheep: Question marks on bluetongue virus serotype 8 in Europe. *Small Ruminant Research* 76, 141–148.
333. Veronesi E, Hamblin C, Mellor PS (2005): Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* 23, 5509–5516.
334. Veronesi E, Venter GJ, Labuschagne K, Mellor PS, Carpenter S (2009): Life-history parameters of *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer in the laboratory at different rearing temperatures. *Veterinary Parasitology* 163, 370–373.
335. Veronesi, E., Darpel, K.E., Hamblin, C., Carpenter, S., Takamatsu, H.H., Anthony, S.J., Elliott, H., Mertens, P.P., Mellor, P.S., 2010. Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4. *Vaccine* 28, 1397–1403.
336. Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, Huismans H (1972): Structure of bluetongue virus capsid. *Journal of Virology* 10, 783–794.
337. Vitour, D., Doceul, V., Ruscanu, S., Chauveau, E., Schwartz-Cornil, I., Zientara, S., 2014. Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus. *Virus Res* 182, 59–70.
338. Waldvogel, A.S., Anderson, G.A., Phillips, D.L., Osburn, B.I., 1992. Infection of bovine fetuses at 120 days' gestation with virulent and avirulent strains of bluetongue virus serotype 11. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15, 53–63.
339. Wechsler SJ, McHolland LE (1988): Susceptibility of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2324–2327.
340. White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D. and Beaty, B.J. (2005) Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *J. Gen. Virol.* 86, 453–62.
341. Wilbur LA, Evermann JF, Levings RL, Stott IR, Starling DE, Spillers CA, Gustafson GA, McKeirman AJ (1994): Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 204, 1762–1765.
342. Williamson S, Woodger N, Darpel K (2008): Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. *Practise* 30, 242–251.
343. Wilson A, Darpel K, Mellor PS (2008): Where does bluetongue virus sleep in winter? *PLOS Biology* 6, 1612–1617.

344. Wilson A, Carpenter S, Gloster J, Mellor PS (2007): Re-emergence of bluetongue in northern Europe in 2007. *Veterinary Record* 161, 487–489.
345. Wilson AJ, Mellor PS (2009): Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364, 2669–2681.
346. Worwa, G., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Chaignat, V., Hofmann, M.A., Griot, C., Maclachlan, N.J., Thuer, B., 2009. Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. *Vet Rec* 164, 499-500.
347. Worwa G, Hilbe M, Chaignat V, Hofmann MA, Griot C, Ehrensperger F, Doherr MG, Thuer B: Virological and pathological findings in Bluetongue virus serotype 8 infected sheep. *Vet Microbiol* 2010, 144:264–273.
348. Yoneyama M., Kikuchi M., et al. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5 (7):730–737.
349. Zhang X., Boyce M., Bhattacharya B., Schein S., Roy P., Zhou Z.H. (2010): Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6292-6297.
350. Zimmer J-Y., Haubruge E., Francis F., Bortels J., Simonon G., Losson B., Mignon B., Paternostre J., De Dekken R., De Deken G., Deblauwe I., Fassote C., Cors R., Defrance T. (2008): Breeding sites of bluetongue vectors in northern Europe. *Veterinary Record* 162:131-136.

9. ПРИЛОГ

Прилог 1. Преглед дијагностикованих случајева катаралне грознице код говеда

Датум потврде ЕЛИСА	Број лаб. извјештаја	Ветеринарска амбуланта	Име власника	ИД газдинства	Општина	Насеље	број узорака	ELISA поз.	PCR поз.	Датум потврде PCR
13-Окт-2014	2952	ПРИМАВЕТ	Мрдак Горица Сања	1093193	Даниловград	Косић	1	1	1	13-Окт-2014
17-Окт-2014	3169;3201	ПРИМАВЕТ	Брајовић Зорица	1088366	Даниловград	Спуж	1	1	1	17-Окт-2014
22-Окт-2014	3363	АНИМАВЕТ	Лаковић Рајко	1187380	Подгорица	Лекићи бб	1	1	нема	
24-Окт-2014	3360	АНИМАВЕТ	Асановић Татјана	1187854	Подгорица	Доњи Кокоти	1	1	нема	
24-Окт-2014	3380;3479	ПРИМАВЕТ	Јелушић Милутин	1090727	Даниловград	Кула Лакић	1	1	1	29-Окт-2014
24-Окт-2014	3348;3398;3722	ПРИМАВЕТ	Брајовић Славка	1089967	Даниловград	Сиге	2	2	2	27-Окт-2014
24-Окт-2014	3348;3398	ПРИМАВЕТ	Раичевић Ковиљка	1094305	Даниловград	Плана	1	1	1	27-Окт-2014
24-Окт-2014	3348;3398	ПРИМАВЕТ	Перовић Савета	1308914	Даниловград	Добро Поље	1	1	1	27-Окт-2014
24-Окт-2014	3380;3479	ПРИМАВЕТ	Решетар Вида	1092707	Даниловград	Ново Село	1	1	1	29-Окт-2014
24-Окт-2014	3380;3479	ПРИМАВЕТ	Бабић Нада	1092912	Даниловград	Ново Село	1	1	1	29-Окт-2014
24-Окт-2014	3380;3479	ПРИМАВЕТ	Радевић Драгољуб	1366525	Даниловград	Косић	1	1	1	29-Окт-2014
28-Окт-2014	3484;3566	АМВ ПРОВИТА	Љумовић Радмила	1093308	Даниловград	Сушица	1	1	1	31-Окт-2014
29-Окт-2014	3571	ПРИМАВЕТ	Оташевић Веселин	1388961	Даниловград	Јабуре	1	1	1	31-Окт-2014
29-Окт-2014	3478	ПРИМАВЕТ	Радуловић Радован	1090949	Даниловград	Поткрај	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3478	ПРИМАВЕТ	Брковић Лабуд	1393026	Даниловград	Пржине	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3478	ПРИМАВЕТ	Распоповић Никола	1090239	Даниловград	Доњи Мартинићи	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3478	ПРИМАВЕТ	Делић Јелена	1404326	Даниловград	Доњи Мартинићи	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3477	ПРИМАВЕТ	Павићевић Жељко	1091991	Даниловград	Лалевићи	1	1	1	29-Окт-2014
31-Окт-2014	3604	АНИМАВЕТ	Драговић Стеван	1443127	Подгорица	Лужница	1	1	нема	
31-Окт-2014	3504	АНИМАВЕТ	Кнежевић Живко	1188929	Подгорица	Дајбабе	1	1	нема	
4-Нов-2014	3699	ПОДГОРИЦА	Божовић Ненад	1199543	Подгорица	Церовица/Пипери	1	1	1	4-Нов-2014
4-Нов-2014	3718	АНИМАВЕТ	Ђоковић Руждија	1189773	Подгорица	Карабушко Поље	1	1	нема	
4-Нов-2014	3680	АНИМАВЕТ	Ђуровић Милован	1438604	Подгорица	Ботун	1	1	нема	
4-Нов-2014	3681	АНИМАВЕТ	Радуновић Милијана		Подгорица	Проговићи	1	1	нема	
5-Нов-2014	3726	ВЕТ МЕДИЦ	Ђосовић Смиља	1224252	Тиват	Доња Ластва	1	1	1	4-Нов-2014
5-Нов-2014	3649	ПРИМАВЕТ	Стојовић Никола	1386998	Даниловград	Мартинићи	1	1	1	5-Нов-2014
7-Нов-2014	3722	ПРИМАВЕТ	Цаковић Радојица	1089707	Даниловград	Мартинићи	1	1	1	7-Нов-2014
7-Нов-2014	3722	ПРИМАВЕТ	Павићевић Коса	1387667	Даниловград	Сретња	1	1	1	7-Нов-2014
7-Нов-2014	3722	ПРИМАВЕТ	Пејовић Драгица	1360264	Даниловград	Сиге	1	1	1	7-Нов-2014
7-Нов-2014	3774	АНИМАВЕТ	Љумовић Зоран	1198577	Подгорица	Копиље	1	1	нема	
7-Нов-2014	3762	АНИМАВЕТ	Нуцуловић Зеф	1206418	Подгорица	Какарицка Гора	1	1	нема	

11-Нов-2014	3808	ВЕТ-МЕДИЦ	Дабовић Владо		Херцег Нови	Херцег Нови	1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3764	ВЕТЕРИНУМ	Пепђоновић Лека	1236613	Улцињ		1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3764	ВЕТЕРИНУМ	Маринковић Лека	1236538	Улцињ		1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3764	ВЕТЕРИНУМ	Перазиић Хасан	1236477	Улцињ		1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3824;4123;3940	ПРИМАВЕТ	Поповић Васо	1092615	Даниловград	Ново Село	3	3	3	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3785	ПРИМАВЕТ	Радоњић Мићко	1387131	Даниловград	Мијокусовић и	1	нег.	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3824	ПРИМАВЕТ	Голубовић Наталија	1094213	Даниловград	Плана	1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3824	ПРИМАВЕТ	Чуровић Милица	1308389	Даниловград	Веља Папрат	1	1	1	11-Нов-2014
13-Нов-2014	3848	АНИМАВЕТ	Радусиновић Марко	1188295	Подгорица	Буроње	1	1	нема	
20-Нов-2014	3940	ПРИМАВЕТ	Јелушић Ковина	1090710	Даниловград	Кула Лакић	1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	3940	ПРИМАВЕТ	Џанкић Вуко	1209204	Даниловград	Ст. Рупа	1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	3940	ПРИМАВЕТ	Рајовић Далибор		Даниловград	Орја Лука	1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	3940	ПРИМАВЕТ	Мраковић Милка	1387889	Даниловград	Доњи Загарач	1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	4065;4294	АНИМАВЕТ	Вукчевић Периша	1325171	Подгорица	Гољемади	2	2	1	1-Дец-2014
20-Нов-2014	3953	ПОДГОРИЦА	Рашовић Живко		Подгорица	Тузи	1	1	1	20-Нов-2014
24-Нов-2014	4124;4123	ПРИМАВЕТ	Ћупић Боса		Даниловград	Плана	1	1	1	24-Нов-2014
24-Нов-2014	4148	АНИМАВЕТ	Вукчевић Вукосава	1325171	Подгорица	Зеленика	1	1	нема	
25-Нов-2014	4123	ПРИМАВЕТ	Калезић Јадранка	1092974	Даниловград	Питома лоза	1	1	1	24-Нов-2014
25-Нов-2014	4184	ПРИМАВЕТ	Караџић Славка	1091847	Даниловград	Лалевићи	1	1	1	27-Нов-2014
25-Нов-2014	4184	ПРИМАВЕТ	Поповић Дејан		Даниловград	Баре Шумановића	1	1	1	27-Нов-2014
25-Нов-2014	4113	ЦЕТИЊЕ	Звицер Зорка	1086904	Цетиње	Бата	1	1	1	24-Нов-2014
1-Дец-2014	4262	ПРИМАВЕТ	Драгутиновић Вјера	1388879	Даниловград	Ливаде Бандићке	1	1	нема	
5-Дец-2014	4310	ПРИМАВЕТ	Марковић Светозар	1395655	Даниловград	Доњи Црнци	1	1	1	5-Дец-2014

Прилог 2. Преглед дијагностикованих случајева катаралне грознице код оваца

Датум потврде ЕЛИСА	Број лаб. извјештаја	Ветеринарска амбуланта	Име власника	ИД газдинства	Општина	Насеље	број узорака	ЕЛИСА поз.	PCR поз.	Датум потврде PCR
17-Окт-2014	3168; 3202;3349	ПРИМАВЕТ	Радоњић Миладин	1443721	Подгорица	Балочи	2	1	1	17-Окт-2014
17-Окт-2014	3168;3202	ПРИМАВЕТ	Мињић Желько Милан	1089677	Даниловград	Градина	1	1	1	17-Окт-2014
17-Окт-2014	3168;3202	ПРИМАВЕТ	Радовић Драгица	1386943	Даниловград	Доњи Мартинићи	3	3	1	17-Окт-2014
17-Окт-2014	3173	АНИМАВЕТ	Турковић Асим		Подгорица	Коник	1	1	1	20-Окт-2014
17-Окт-2014	3174/3212	АНИМАВЕТ	Ђурковић Драго		Подгорица	Дахна бб	1	1	1	20-Окт-2014
18-Окт-2014	3209; 3293; 3485	ПОДГОРИЦА	Јовићевић Боро	1428346	Цетиње	Чешљари	85	2	да	23-Окт-2014
18-Окт-2014	3187;3378	ПРИМАВЕТ	Пејовић Драган	1355765	Подгорица	Балоче	2	1	1	27-Окт-2014
20-Окт-2014	3246;3378	ПРИМАВЕТ	Вуксановић Слободан	1386844	Даниловград	Горњи Мартинићи	1	1	1	27-Окт-2014
22-Окт-2014	3312	АНИМАВЕТ	Гојчај Пашко	1437300	Подгорица	Вуксан Лекићи	2	2	нема	

23-Окт-2014	3349	ПРИМАВЕТ	Шћепановић Светозар		Даниловград	Плана	1	1	1	27-Окт-2014
23-Окт-2014	3349	ПРИМАВЕТ	Радуловић Мирко	1088557	Даниловград	Спуж	1	1	1	27-Окт-2014
23-Окт-2014	3266	АНИМАВЕТ	Цамај Мартин	1192476	Подгорица	Тузи/Спиње	1	1	нема	
23-Окт-2014	3349:3398	ПРИМАВЕТ	Тодоровић Душанка	1090192	Даниловград	Доњи Мартинићи	1	1	1	27-Окт-2014
23-Окт-2014	3349:3398	ПРИМАВЕТ	Стојковић Бранко	1441390	Даниловград	Доњи Мартинићи	2	2	2	27-Окт-2014
24-Окт-2014	3377	АНИМАВЕТ	Ђокај Фран	1192056	Подгорица	Џијевна	1	1	нема	
27-Окт-2014	3379;3523	ПРИМАВЕТ	Савовић Миладин		Даниловград	Даљам	1	1	1	31-Окт-2014
27-Окт-2014	3397;3522	ПРИМАВЕТ	Изгаревић Мироче	1366334	Даниловград	Врежегрмци	1	1	1	31-Окт-2014
27-Окт-2014	3379;3721	ПРИМАВЕТ	Брајовић Радуре	1093377	Даниловград	Косић	3	3	3	27-Окт-2014
28-Окт-2014	3417	ВЕТЕРИНАР-ТОПЛИЦА	Цуровић Жељко	1236033	Улцињ	Свети Ђорђе	1	1	1	28-Окт-2014
28-Окт-2014	3417	ВЕТЕРИНАР-ТОПЛИЦА	Слаковић Адем	1224559	Улцињ	Нова Махала	3	3	3	28-Окт-2014
28-Окт-2014	3417	ВЕТЕРИНАР-ТОПЛИЦА	Лешевић Мурат	1230819	Улцињ	Брајша	1	1	1	28-Окт-2014
28-Окт-2014	3417	ВЕТЕРИНАР-ТОПЛИЦА	Краја Шућурија	1229011	Улцињ	Пистула	3	3	3	28-Окт-2014
28-Окт-2014	3417	ВЕТЕРИНАР-ТОПЛИЦА	Аљошевић Вебија	1231625	Улцињ	Горње Краваре	3	1	1	28-Окт-2014
28-Окт-2014	3483;3567	ПРИМАВЕТ	Богдановић Добровоје	1092462	Даниловград	Грбе	1	1	1	31-Окт-2014
29-Окт-2014	3480	ПРИМАВЕТ	Распоповић Драган	1089035	Даниловград	Мартинићи	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3480	ПРИМАВЕТ	Перовић Драгољуб	1366525	Даниловград	Бороњина	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3477	ПРИМАВЕТ	Павићевић Обрен	1387797	Даниловград	Слап	2	2	2	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3480	ПРИМАВЕТ	Ћирковић Драган	1360059	Даниловград	Виш	1	1	1	29-Окт-2014
29-Окт-2014	3501	ВЕТ-МЕДИЦ	Перишић Симо/Божо	1370652	Херцег Нови	Кути/Зеленика	5	5	5	29-Окт-2014
30-Окт-2014	3528	АНИМАВЕТ	Ницај Пренка	1190779	Подгорица	Тузи	1	1	нема	
30-Окт-2014	3575	АНИМАВЕТ	Цамај Ђето	1192469	Подгорица	Тузи	1	1	нема	
30-Окт-2014	3480;	ПРИМАВЕТ	Ускоковић Загорка	1366624	Даниловград	До Пјешивачки	1	негативан	1	27-Окт-2014
31-Окт-2014	3588	ВЕТ-МЕДИЦ	Брајовић Божо		Херцег Нови	Мојдеж	1	1	0	31-Окт-2014
31-Окт-2014	3523;3397	ПРИМАВЕТ	Вујадиновић Вукман	1089622	Даниловград	Градина	1	1	1	31-Окт-2014
31-Окт-2014	3523;3397	ПРИМАВЕТ	Булатовић Милотије	1386837	Даниловград	Горњи Мартинићи	1	1	1	31-Окт-2014
31-Окт-2014	3522	ПРИМАВЕТ	Вукадиновић Веселин	1388749	Даниловград	Ливаде Бандићке	1	1	1	31-Окт-2014
31-Окт-2014	3603	ВЕТЕРИНАРИ А ДОО	Задрима Деда	1237016	Улцињ	Сутјел	3	3	нема	нема
31-Окт-2014	3590	АНИМАВЕТ	Љекочевић Томо	1201680	Подгорица	Тузи	2	2	нема	
1-Нов-2014	3505	АНИМАВЕТ	Радоњић Винка	1443158	Подгорица	Лужница	2	2	нема	
4-Нов-2014	3636	ПОДГОРИЦА	Радуновић Вукота		Подгорица	Прођоновићи	1	1	1	4-Нов-2014
4-Нов-2014	3725;4233	АНИМАВЕТ	Вукчевић Светозар	1346251	Подгорица	Штеке	3	3	нема	
5-Нов-2014	3679	НИКШИЋ	Ковачевић Бранко		Никшић	Озринићи	1	1	1	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3631	Херцег Нови	Радановић Саво		Херцег Нови	Херцег Нови	1	1	1	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3630	Херцег Нови	Дабовић Срђа		Херцег Нови	Сасовићи	3	3	3	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3677	ВЕТ-МЕДИЦ	Песторић Марија	1097061	Херцег Нови	Кути/Зеленика	2	2	2	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3676	ВЕТ-МЕДИЦ	Радмиливић Тодор	1346862	Херцег Нови	Кути/Зеленика	1	1	1	5-Нов-2014

5-Нов-2014	3648	ПРИМАВЕТ	Радовић Мирко	1386929	Даниловград	Мартинићи	1	1	1	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3379;3647	ПРИМАВЕТ	Јовановић Радован	1386295	Даниловград	Кујава	1	1	1	5-Нов-2014
5-Нов-2014	3678	ВЕТ-МЕДИЦ	Ђорђевић Рајко	1346818	Херцег Нови	Кумбор	1	1	1	5-Нов-2014
7-Нов-2014	3737	ВЕТЕРИНУМ	Никезић Ибрахим	1226386	Улцињ	Пистула	1	1	нема	нема
7-Нов-2014	3738	ВЕТЕРИНУМ	Радовић Тефик		Бар		2	2	нема	нема
7-Нов-2014	3721	ПРИМАВЕТ	Вукадиновић Милорад	1388817	Даниловград	Бандићи	2	2	2	7-Нов-2014
7-Нов-2014	3763	ПОДГОРИЦА	Перковић Ђоко	1210408	Подгорица	Какаричка гора	1	1	нема	
10-Нов-2014	3823	ПРИМАВЕТ	Велашевић Мирослав	1441765	Даниловград	Градина	1	1	1	11-Нов-2014
11-Нов-2014	3784	ПРИМАВЕТ	Мијатовић Дарко	1386776	Даниловград	Орја Лука	1	1	1	11-Нов-2014
12-Нов-2014	3900	АНИМАВЕТ	Бојић Марко		Подгорица	Муртовина	1	1	нема	
18-Нов-2014	4006	АНИМАВЕТ	Ускоковић Веско		Подгорица	Лијешње	1	1	нема	
20-Нов-2014	3897	Херцег Нови	Вујиновић Милош		Херцег Нови		1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	4064	АНИМАВЕТ	Митровић Ваилије	143758	Подгорица	Шљункара-Зета	1	1		
20-Нов-2014	3931	ВЕТ-МЕДИЦ	Шабовић Рајко	1346886	Херцег Нови	Мојдеж	1	1	1	20-Нов-2014
20-Нов-2014	4079	АНИМАВЕТ	Ницај Јелена	1437591	Подгорица	Спиње	2	2	нема	
20-Нов-2014	4063	МОНТВЕТ	Бојановић Дарко	1194975	Подгорица	Бери	7	6	нема	
20-Нов-2014	4078	ПОДГОРИЦА	Перић Данка	1209853	Подгорица	Какаричка гора	1	1	1	20-Нов-2014
21-Нов-2014	4125;4254	МОНТВЕТ	Вуковић Раде	1206845	Подгорица	Пипери	2	2	нема	
24-Нов-2014	3959	ВЕТ-МЕДИЦ	Манојловић Богослав		Херцег Нови	Жвиње	1	1	1	20-Нов-2014
24-Нов-2014	4124;4123	ПРИМАВЕТ	Ђулић Боса		Даниловград	Плана	2	2	2	24-Нов-2014
24-Нов-2014	4124	ПРИМАВЕТ	Брајовић Зоран	1090574	Даниловград	Јеленак	1	1	1	24-Нов-2014
24-Нов-2014	3939	ПРИМАВЕТ	Стојановић Драган		Даниловград	Доњи Загарач	1	1	1	20-Нов-2014
25-Нов-2014	4057	ПРИМАВЕТ	Кнежевић Миодраг	1441185	Даниловград	Кујава	1	1	1	20-Нов-2014
25-Нов-2014	4057	ПРИМАВЕТ	Муратовић Гавро	1321043	Даниловград	Градина	1	1	1	20-Нов-2014
25-Нов-2014	4057	ПРИМАВЕТ	Станишић Миливоје		Даниловград	Баре Шумановића	1	1	1	20-Нов-2014
25-Нов-2014	4057	ПРИМАВЕТ	Пековић Панто	1393088	Даниловград	Мартинићи	1	1	1	20-Нов-2014
25-Нов-2014	3939	ПРИМАВЕТ	Шарановић Вељко	1090772	Даниловград	Поткрај Шарановића	1	негативан	1	20-Нов-2014
28-Нов-2014	4183	ПРИМАВЕТ	Ђуровић Драган	1366815	Даниловград	Јастреб	1	1	1	27-Нов-2014
28-Нов-2014	4183	ПРИМАВЕТ	Мишковић Зоран	1441468	Даниловград	Мијокусовићи	1	1	1	27-Нов-2014
5-Дец-2014	4310	ПРИМАВЕТ	Божовић Ђорђије	1441412	Даниловград	Спуж	1	1	1	5-Дец-2014

Прилог 3. Преглед дијагностикованих случајева катаралне грознице код коза

Општина	насеље	Број узорака	ЕЛИСА поз.	PCR поз	Датум потврде PCR
Улцињ		3	3	1	3-Дец-2014

Прилог 4. Вируси најсроднији у Сегменту-2 са BTV-4 MNT2014/01

Бр.	Серотип/име	Референтна ознака / приступни број	Бр. поређених нт*/ дужина Сег-2	Идентичности %
1	BTV-4 Greece 2014	GRE2014/01	2926/2926	99.9%
2	BTV-4 Bulgaria 2014	BUL2014/18	2926/2926	100%
3	BTV-4 Bulgaria 2014	BUL2014/07	2926/2926	100%
4	BTV-4 Kosovo 2014	KOS2014/01	2926/2926	100%
5	BTV-4 Serbia 2014	SER2014/01	2926/2926	100%
6	BTV-4 Hungary 2014	HUN2014/01	2926/2926	100%
7	BTV-4 Sudan, 1983	SUD1983/01 [AJ585166]	2926/2926	95.8%
8	BTV-4 Italy, 2003	[DQ191281]	2926/2926	94.6%
9	BTV-4 Sardinia, 2003	[DQ191280]	2926/2926	94.5%

10	BTV-4 Portugal: Alandroal, 2004	[EF434176]	2871/2871	94.5%
11	BTV-4 Corsica: France, 2003	[AY839945]	2871/2871	94.3%
12	BTV-4 Spain 2010	4SPA2010/01	2926/2926	94.3%
13	BTV-4 Greece 2012	GRE2012/02	2926/2926	93%
14	BTV-4 Cyprus 2011	CYP2011/05	2926/2926	93%
15	BTV-4 Greece: Rhodes island, 1999	[DQ191277]	2926/2926	94.2%
16	BTV-4 Greece isolate of 1999	[AY839947]	2871/1871	94.1%
17	BTV-4 Greece: isolate of 2000	[AY839946]	2871/1871	94.1%
18	BTV-4 Turkey, 1999	[DQ825670]	2871/2871	93.9%
19	BTV-4 Israel, 2001	[DQ191278]	2926/2926	93.4%
Сродство са референтним и вакциналним вирусним сојевима				

Бр.	Тип вируса/име	Референтна ознака / приступни број	Бр. поређених нт* / дужина Сег-2	Идентичности %
1	BTV-4 South Africa (референтни сој)	RSArtrr/04 [AJ585125]	2926/2926	94.2%
2	BTV4-South Africa (вакцинални сој)	[JN255943]	2926/2926	88.6%

* нт, нуклеотиди

10. БИОГРАФИЈА

Рођен сам 6. октобра 1968. године у Подгорици, гдје завршавам Основну школу и Гимназију. Ветеринарски факултет у Београду уписујем школске 1988/89, а на истом са просечном оцјеном 8,82 дипломирам 1998. године. Школске 1998/99 уписујем магистарске студије из области Патологија и терапија животиња.

Радни однос у Ветеринарском заводу Биотехничког института у Подгорици заснивам 1999. године. Издавањем Ветеринарског завода из Биотехничког института формира се Специјалистичка ветеринарска лабораторија, гдје радим у одељењу за Патологију и патоморфолошку дијагностику болести домаћих животиња.

Децембра 2005. године одбранио сам магистарску тезу под насловом „Имунохистохемијска и морфолошка испитивања туморских ћелија Марекове болести живине“.