

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

**Jasna Z. Prodanov-Radulović**

**UTICAJ KOLOSTRALNIH ANTITELA NA  
STEPEN IMUNOSTI PRASADI  
VAKCINISANIH PROTIV  
KLASIČNE KUGE SVINJA**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2013.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**Jasna Z. Prodanov-Radulović**

**INFLUENCE OF COLOSTRAL  
ANTIBODIES ON IMMUNITY OF  
PIGLETS VACCINATED AGAINST  
CLASSICAL SWINE FEVER**

**PhD thesis**

**Belgrade, 2013**

**MENTOR:**

- **prof. dr Miroslav Valčić**, redovni profesor,  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

**Članovi komisije:**

- prof. dr Nenad Milić, redovni profesor,  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd
- dr Sava Lazić, naučni savetnik,  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad
- dr Dragica Stojanović, naučni savetnik,  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad
- dr Jelena Nedeljković-Trailović, docent  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

**Datum odbrane:**

**UTICAJ KOLOSTRALNIH ANTITELA  
NA STEPEN IMUNOSTI PRASADI  
VAKCINISANIH PROTIV KLASIČNE KUGE SVINJA**

**REZIME**

Cilj ispitivanja je bio da se ustanovi da li kod prasadi poreklom od vakcinisanih krmača, posle vakcinacije sa atenuisanom i subjediničnom vakcinom, dolazi do interferencije kolostralnog imuniteta sa sintezom sopstvenih antitela i da li postvakcinalni imuni odgovor sprečava pojavu oboljenja, izlučivanje virusa i širenje klasične kuge svinja (KKS).

Ogledna ispitivanja su obavljena 60 prasadi, uzrasta 45 dana (18 nevakcinisane prasadi poreklom od nevakcinisanih krmača i 42 nevakcinisana praseta poreklom od krmača vakcinisanih Kina (K)-sojem virusa KKS). Eksperimentalna ispitivanja su podeljena u dve faze: prva faza je obuhvatala ispitivanja sa primenom atenuisane (K-soj) vakcine dok je druga faza obuhvatala primenu subjedinične vakcine. U cilju utvrđivanja prisustva kolostralnih antitela u serumu prasadi, izvršeno je preliminarno uzorkovanje krvi 100 prasadi uzrasta 43 dana. Na osnovu rezultata seroloških ispitivanja (ELISA test), formirane su po tri eksperimentalne grupe, od po sedam jedinki u grupi: pozitivna grupa (utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela), negativna grupa (nije utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela) i treća grupa prasadi kod kojih su antitela utvrđena na granici detektabilnosti (sumnjiva grupa).

U uzrastu 45 dana obavljena je vakcinacija tri grupe prasadi atenuisanom (K-soj) dok su preostale tri grupe prasadi vakcinisane i revakcinisane subjediničnom vakcinom. Četrnaest dana nakon vakcinacije K-sojem odnosno revakcinacije subjediničnom vakcinom izvršena je veštačka infekcija prasadi virulentnim sojem virusa KKS (Beker soj). Jedan dan nakon veštačke infekcije u cilju kontrole izlučivanja virusa u svaku grupu su dodana po 2 neimuna praseta, poreklom od nevakcinisanih krmača.

Nakon veštačke infekcije, vršena je kontinuirana klinička opservacija jedinki i od svakog praseta je uzorkovana krv 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 i 28. dana nakon veštačke infekcije u cilju kontrole prisustva specifičnih antitela protiv virusa

KKS i viremije (ELISA test i RT-PCR). Kontrola izlučivanja virusa KKS iz organizma vakcinisanih, veštački inficiranih prasadi vršena je tehnikom RT-PCR na uzorcima orofaringealnih i rektalnih briseva (0, 2, 4, 6, 8 i 10 dpi). Nakon uginuća ili žrtvovanja prasadi, obavljena je obdukcija, patomorfološki pregled i uzorkovanje organa i tkiva u cilju kontrole na prisustvo i distribuciju virusa KKS (ELISA test i RT-PCR).

Ispitivanjem uzoraka krvnih seruma prasadi starih 43 dana, poreklom od krmača vakcinisanih K-sojem virusa KKS na prisustvo kolostralnih antitela ELISA testom, kod 44% ispitanih jedinki utvrđeno je prisustvo kolostralnih antitela, dok je kod više od polovine prasadi utvrđen negativan nalaz ili prisustvo kolostralnih antitela, na granici detekcije. Kod prasadi vakcinisane K-sojem virusa KKS, kolostralna antitela su suprimirala imunološki odgovor organizma na vakcinalni antigen. Što je viši nivo kolostralnih antitela pri vakcinaciji, snažnija je inhibicija razvoja aktivnog imuniteta odnosno niži je nivo sinteze sopstvenih antitela nakon veštačke infekcije. Utvrđeno je da prasad vakcinisana K-sojem virusa KKS, posle veštačke infekcije virulentnim sojem, izlučuju i prenose virus KKS na seronegativne tj. nevakcinisane životinje u kohabitaciji.

Vakcinacijom prasadi poreklom od krmača višekratno vakcinisanih K-sojem virusa, subjediničnom vakcinom u uzrastu od 45 (prva doza) i 73 (druga doza) dana, postignut je solidan aktivni imunološki odgovor u smislu sinteze specifičnih antitela. Prasad vakcinisana subjediničnom vakcinom, posle veštačke infekcije izlučivala su virus, ali se nije odigrala infekcija nevakcinisanih životinja u kohabitaciji.

Kod prasadi vakcinisanih atenuisanom i subjediničnom vakcinom, primenom antigen ELISA testa i tehnike RT-PCR, posle veštačke infekcije ustanovljena je replikacija i izlučivanje virusa, bez izraženih kliničkih simptoma bolesti (latentna infekcija). U grupi prasadi vakcinisanih subjediničnom vakcinom, kontrolom oronazalnih i rektalnih briseva utvrđen je genom virusa KKS (RT-PCR), i kontaminisanje okoline virusom i horizontalno prenošenje infekcije u terenskim uslovima se ne može isključiti.

Primenom postojećih programa vakcinacije K-sojem virusa, supklinički inficirane životinje (kliconoše), mogu da budu prisutne u populaciji i da doprinesu širenju KKS. Dobijeni rezultati ukazuju da subjedinične vakcine mogu da imaju potencijalnu primenu u programu kontrole KKS u regionima u kojima se obolenje javlja enzootski. Postignuti rezultati ispitivanja ukazuju da je pored mera imunoprofilakse, u

uslovima enzootske infekcije od značaja serološka kontrola u cilju sagledavanja imunološkog statusa zapata (kolostralni imunitet) i procene efikasnosti vakcinacije protiv KKS.

**Ključne reči:** klasična kuga svinja, kolostralna antitela, interferencija, Kina soj, subjedinična vakcina

**Naučna oblast:** Klinička veterina

**Uža naučna oblast:** Zarazne bolesti i epizootiologija

**UDK broj:** 619:616.9-036.22

# **INFLUENCE OF COLOSTRAL ANTIBODIES ON IMMUNITY OF PIGLETS VACCINATED AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER**

## **SUMMARY**

The aim of the research was to establish possible interference of colostrum immunity with the production of own antibodies in piglets originating from vaccinated sows, after immunization with attenuated and subunit vaccine, as well as to examine whether post-vaccination immune response prevents the development of the disease, virus shedding and spread of the Classical Swine Fever (CSF).

The experimental research included 60 piglets aged 45 days (18 non-vaccinated piglets originating from non-vaccinated sows and 42 non-vaccinated piglets originating from sows immunized with China (C)-strain of CSF virus). Experimental research was conducted in two phases: the first phase encompassed a trial with the attenuated (C-strain) vaccine, whilst the second phase was focused on the application of a subunit vaccine. To determine presence of colostrum antibodies in the serum of piglets, blood sampling was performed in 100 piglets aged 43 days. Based on serological examination (ELISA test), three experimental groups consisting of seven animals each were formed: Positive Group (confirmed presence of colostrum antibodies), Negative Group (presence of colostrum antibodies not confirmed) and Suspect Group (animals in which the antibodies were detected at the detection limit).

At the age of 45 days, the piglets from the first three groups were vaccinated with attenuated (C-strain) and remaining three groups were vaccinated and revaccinated with subunit vaccine. Fourteen days after vaccination with C-strain and revaccination with the subunit vaccine, the piglets were challenged with virulent CSF virus strain (Baker strain). One day following artificial infection and with an aim of controlling virus shedding, two non-immune piglets originating from non-vaccinated sows were introduced into each group.

After artificial infection, continuous clinical monitoring of animals was performed, and blood samples were obtained from each individual piglet on days 0, 2,

4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 and 28 post infection (dpi) to detect the presence of specific antibodies against CSF and viraemia (ELISA test and RT-PCR). The control of CSF virus shedding by vaccinated, artificially infected piglets was performed by RT-PCR analysis of oropharyngeal and rectal swabs (0, 2, 4, 6, 8 and 10 dpi). After death or sacrificing the animals, autopsy was performed along with the patho-morphological examination and organ- and tissue sampling to the purpose of determining the presence and distribution of CSF virus (ELISA and RT-PCR).

Control of colostral antibodies in the blood sera from piglets at age 43 days, originating from sows immunized with C-strain of CSF virus, revealed their presence in 44% of investigated piglets, whereas negative or suspect finding was obtained in more than a half of the animals. In piglets vaccinated with C-strain of CSF virus, colostral antibodies suppressed the immune response to vaccine antigen. It was established that higher levels of colostral antibodies at vaccination are associated with more potent inhibition of active immunity development, i.e. lower level of synthesis of own antibodies after artificial infection. In the group of piglets vaccinated with C-strain of CSF virus, following artificial infection with virulent viral strain, shedding and contact infection in seronegative i.e. unvaccinated animals in cohabitation was detected.

Application of subunit vaccine (the first dose at age 45 and second dose at age 73 days) in piglets originating from sows vaccinated with C-strain resulted in good active immune response in a view of synthesis of specific antibodies. In the group of piglets vaccinated with subunit vaccine following artificial infection virus shedding (carrier status) was confirmed but without contact infection in unvaccinated animals in cohabitation.

Applying antigen ELISA test and RT-PCR analysis, in piglets vaccinated with attenuated and subunit vaccine, after artificial infection replication and excretion of virus was detected, without distinct clinical symptoms of CSF (latent infection). In the group of piglets vaccinated with subunit vaccine, by the control of oropharyngeal and rectal swabs the genome of CSF virus was detected (RT-PCR), and environmental contamination and horizontal transmission of the virus infection in the field conditions, however cannot be excluded.

Applying of existing vaccination programs with the C-strain virus subclinically infected animals (carriers) may be present in the population and contribute to the spread



of CSF. The results indicate that subunit vaccine may have potential application in the control of CSF in regions where the disease is enzootic. The obtained results strongly indicate that besides the immunoprophylactic measures, serological control is of paramount importance in conditions of enzootic infection, as it enables better insight in the immune status of the herd (colostral immunity) and better assessment of the effectiveness of vaccination against CSF.

**Key words:** classical swine fever, colostral antibodies, interference, China-strain, subunit vaccine

**Major Field of Study:** Clinical Veterinary Medicine

**Special Field of Study:** Infectious Diseases and Epizootiology

**UDK Number:** 619:616.9-036.22

## SADRŽAJ

<b>REZIME .....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>3</b>
2.1. Istorijat bolesti .....	3
2.2. Etiologija .....	4
2.3. Epizootiologija klasične kuge svinja .....	10
2.4. Patogeneza klasične kuge svinja .....	18
2.5. Klinička slika klasične kuge svinja.....	25
2.6. Patomorfološke promene .....	30
2.7. Imunoprofilaksa klasične kuge svinja .....	34
2.8. Kontrola i eradikacija klasične kuge svinja .....	49
2.9. Molekularna epidemiologija klasične kuge svinja .....	55
2.10. Dijagnostika klasične kuge svinja .....	57
<b>3. CILJ I ZADACI RADA .....</b>	<b>65</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE RADA .....</b>	<b>66</b>
4.1. MATERIJAL .....	66
4.1.1. Ogladne životinje .....	66
4.1.2. Eksperimentalni dizajn .....	66
4.1.3. Uzorci krvi, krvnih seruma, briseva i organa .....	68
4.1.4. Eksperimentalno dijagnostički blok .....	69
4.2. METODE .....	70
4.2.1. Klinički i patomorfološki pregled .....	70
4.2.2. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa klasične kuge svinja (ELISA test) .....	70
4.2.3. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVDV) – virusneutralizacioni test .....	73
4.2.4. Pregled krvi i organa eksperimentalnih životinja na prisustvo antigena virusa klasične kuge svinja (ELISA test) .....	74

4.2.5. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo antitela protiv proteina E <sup>ms</sup> virusa klasične kuge svinja .....	77
4.2.6. Reverzna transkripcija-lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) .....	80
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>85</b>
5.1. Rezultati pregleda krvnih seruma prasadi na prisustvo specifičnih (kolostralnih) antitela protiv virusa KKS .....	85
5.2. Rezultati pregleda krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVDV) .....	85
5.3. Rezultati ispitivanja serološkog statusa eksperimentalne prasadi nakon vakcinacije i veštačke infekcije: dinamika perzistencije specifičnih antitela protiv virusa KKS... .....	86
5.4. Rezultati pregleda krvi eksperimentalnih životinja na prisustvo antigena i genoma virusa klasične kuge svinja .....	91
5.5. Rezultati pregleda orofaringealnih i rektalnih briseva veštački inficirane prasadi ...	98
5.6. Rezultati kliničkog pregleda eksperimentalne prasadi .....	101
5.7. Rezultati pregleda organa i tkiva na prisustvo virusa klasične kuge svinja .....	108
5.8. Rezultati patomorfološkog pregleda eksperimentalne prasadi .....	113
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>114</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>133</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>135</b>
<b>9. PRILOG .....</b>	<b>144</b>
9.1. Tabele sa prikazom patomorfoloških promena .....	144
9.2. Foto-dokumentacija .....	148
<b>BIOGRAFIJA .....</b>	<b>CLX</b>
<b>IZJAVA O AUTORSTVU .....</b>	<b>CLXII</b>
<b>IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA .....</b>	<b>CLXIII</b>
<b>IZJAVA O KORIŠĆENJU .....</b>	<b>CLXIV</b>

## 1. UVOD

---

U regionima gde je klasična kuga svinja (KKS) enzootski prisutna, vakcinacija predstavlja važan element u kontroli, suzbijanju i iskorenjivanju oboljenja u populaciji domaćih svinja. U Republici Srbiji program suzbijanja i iskorenjivanja KKS je definisan zakonom i vakcinacija prasadi se obavlja u starosti od 45 do 60 dana; vakcinacija nazimica i krmača najkasnije 15 dana pre svakog pripusta i vakcinacija nerastova dva puta godišnje. Vakcinacija svinja se obavlja atenuisanom vakcinom koja sadrži Kina (K) soj virusa KKS.

Kada je u pitanju primena atenuisanih vakcina protiv KKS, poznato je da kolostralni imunitet prasadi interferira sa indukovanjem aktivnog imuniteta nakon vakcinacije: što je viši nivo kolostralnih antitela pri vakcinaciji, to je snažnija inhibicija razvoja aktivnog imuniteta. Sa druge strane, u uslovima enzootske KKS, farme svinja i individualni proizvodni sektor su okruženi prisustvom infekcije, i u interesu je da se svinje vakcinišu što je moguće ranije u cilju postizanja imunološke zaštite i sprečavanja daljeg širenja KKS. Međutim, postavlja se pitanje da li prasad vakcinisana u uzrastu od 45 do 60 dana poreklom od vakcinisanih krmača mogu oboleti i predstavljati izvor infekcije i doprineti održavanju KKS u regionu.

Zapažanja sa terena tokom zadnjih 10 godina ukazuju da se na farmama svinja koje sprovode program imunoprofilakse protiv KKS, infekcija javlja u kategoriji još nevakcinisane kao i vakcinisane zalučene prasadi (uzrast od 45 do 60 dana), sa širenjem infekcije na prasad na sisi i tovljenike. Smatra se da u kategoriji još nevakcinisane zalučene prasadi kolostralna antitela nisu na zaštitnom nivou dok je kod vakcinisane zalučene prasadi moguć „proboj“ imuniteta kao posledica interferencije kolostralnog imuniteta sa sintezom sopstvenih antitela. Stoga se postavlja pitanje imunološkog statusa prasadi u trenutku i nakon vakcinacije protiv KKS odnosno da li kolostralni imunitet utiče na aktivni imunitet i da li su prasad zaštićena nakon vakcinacije.

Sa druge strane, primena subjediničnih vakcina omogućava razlikovanje inficiranih jedinki u vakcinisanoj populaciji i jedan novi način kontrole KKS, prilagođen epizootiološkoj situaciji. Subjedinična vakcina indukuje solidnu zaštitu na nivou zapata ali su malobrojna istraživanja sa aspekta mogućnosti njene primene kod prasadi poreklom od krmača vakcinisanih atenuisanim sojem virusa KKS.

Zbog svega gore navedenog, odlučili smo da u kontrolisanim uslovima eksperimentalne infekcije, ispitamo imunogeni efekat atenuisane i subjedinične (marker) vakcine sa aspekta kolostralne zaštite u heterogenoj populaciji prasadi, koja se i sreće u terenskim uslovima na farmama svinja u Srbiji. Rezultati istraživanja treba da omoguće nova saznanja o efikasnosti vakcinacije u populaciji zalučene prasadi koja su i najrizičnija kategorija sa aspekta infekcije virusom KKS u kritičnom periodu kada je u pitanju odnos aktivne imunizacije i pasivnog imuniteta.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2. 1. ISTORIJAT BOLESTI**

---

Iako postoje podaci iz perioda 1818 - 1888. godine o pojavi bolesti koja po opisu odgovara klasičnoj kugi svinja (KKS), oboljenje je prvi put ustanovljeno 1833. godine u državi Ohajo, Sjedinjene Američke Države (SAD). Prvi pisani dokument o KKS je objavljen 1888. godine u vidu saopštenja sa opisom bolesti, gde se navode pretpostavke da je u SAD zaraza uneta svinjama iz Evrope, dopremljenim u cilju poboljšanja rasnog sastava. Ovaj podatak nije u saglasnostima sa evropskim izvorima i nikada nije potvrđen ili opovrgnut (11). U Francuskoj je 1822. godine opisano oboljenje koje po opisu odgovara KKS (30). Velika Britanija je bila prva država koja je 1879. godine proglasila KKS kao oboljenje koje se obavezno prijavljuje i suzbija po zakonu. Istorijski gledano, poreklo KKS ostaje nerazjašnjeno (11). Bez obzira na poreklo, KKS je do 1860. godine bila raširena u Evropi i Americi, pri čemu je razvoj železnice sredinom 19. veka odigrao značajnu ulogu u širenju infekcije (30).

Etiologija oboljenja je u početku bila nejasna i smatralo se da je uzročnik „bacillus“ kuge svinja. Prenosenje oboljenja telesnim tečnostima obolelih svinja su dokazali *de Schweinitz i Dorset* 1903. godine (30) dok je virusna etiologija oboljenja utvrđena 1904. godine (28). Prvi izolati evropskog virusa KKS dobijeni su u periodu između 1905. i 1912. godine u Engleskoj, Holandiji i Nemačkoj (14).

Istorijske prekretnice u kontroli oboljenja predstavljaju primena sero-profilakse od 1907. godine (38) i proizvodnja i primena inaktivisanih (kristal violet) vakcina u periodu od 1936-1970. godine (45), dok razvoj atenuisanih vakcina obuhvata period 1952-1978. godine. Vakcine sa Kina (K) sojem prvi put opisane 1963. godine (28).

Početak ovog veka postignut je značajan napredak u razvoju vakcina protiv KKS (3), prva subjedinična vakcina je proizvedena 1993. godine (28). Oralna imunizacija divljih svinja je prvi put primenjena 1993. godine u Nemačkoj, vakcinom koja sadrži lapinizirani K-soj virusa KKS („C-soj Riems“) (44).

## 2.2. ETIOLOGIJA

---

### Taksonomija

Virus klasične kuge svinja (KKS) pripada rodu *Pestivirus*, porodici *Flaviviridae*, koja obuhvata jednolančane RNK viruse sa omotačem (rodovi *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus*). Na osnovu zajedničkih karakteristika u rod *Pestivirus* svrstani su virus bovine virusne dijareje (BVDV-1 i BVDV-2), virus "border" bolesti ovaca (BDV), pestivirusi irvasa i žirafa (56) i tri grupe neklasifikovanih pestivirusa: atipični pestivirusi preživara, dva pestirusa negovedeg porekla („Bungowannah“ virus svinja i tuniski izolati virusa ovaca) (99). Članovi roda *Pestivirus* su antigeno i genetski srodni (56).

### Virus i njegov genom

Virus KKS je sferičnog oblika, dijametra 40-50 nm sa omotačem u vidu lipidne membrane sa koje se pružaju strukturni proteini i koja obavlja nukleokapsid ikozoedarne simetrije, promera 27-29 nm (62). Genom virusa je jednolančana RNK, pozitivnog polariteta, smeštena unutar kapsida, veličine oko 12 kilobaza (28). Sekvencioniranjem genoma utvrđeno je da se virus sastoji od 5' i 3' visoko konzervisanih netranslatornih regiona (UTR) i jednog bočnog otvorenog rama za očitavanje („open reading frame“ ORF) koji kodira sintezu poliproteina od 3898 amino kiselina (40). Nakon ulaska virusa i oslobađanja virusne RNK u ćeliju, nastaje 12 proteina: 4 strukturna: C (p14), E<sup>ms</sup> [gp48 (E0)], E1 (gp33), E2 [E1 (gp55)], 8 nestrukturnih proteina: N<sup>pro</sup>(p23), p7, NS2-3 [NS2, NS3 (p80)], NS4A, NS4B, NS5A, NS5B i 2 proteina prekursora (E2-p7 i NS2-3). Redosled proteina u poliproteinu je sledeći: NH<sub>2</sub>-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ms</sup>-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH.

Tri strukturna proteina omotača (E proteini) su glikolizovana. Izuzev proteina N<sup>pro</sup>, svi proteini su esencijalni za životni ciklus virusa dok su za replikaciju RNK dovoljni proteini od NS3 do NS5B (64).

Prvi nestrukturni protein na N kraju poliproteina je N-terminalna proteaza (N<sup>pro</sup>), koja ima autoproteolitičku aktivnost za ko-translatorno odvajanje od nascentnog poliproteina (66). Podudarnost sekvenci aminokiselina N<sup>pro</sup> u rodu *Pestivirus* je preko

70%. Nakon infekcije, N<sup>pro</sup> ne indukuje sintezu detektabilnih antitela protiv virusa KKS. Protein N<sup>pro</sup> je uključen u virulenciju i delecijom istog utvrđen je gubitak virulencije za svinje (28).

Protein C i glikoproteini E<sup>ms</sup>, E1 i E2 predstavljaju strukturne komponente virusa. Tri glikoproteina su determinante virulencije (64) pri čemu su E2 i E<sup>ms</sup> ključni za replikaciju virusa, nalaze se u i na površini inficiranih ćelija i uključeni su u virusne receptore. Proteini E<sup>ms</sup> i E2 imaju ulogu u pričvršćivanju, ulasku virusa u ćelije domaćina i imunološkom odgovoru tj. indukuju sintezu specifičnih antitela i nastanak zaštitnog imuniteta u organizmu. Proteini E<sup>ms</sup>, E1 i E2 grade 13 epitopa (oznake 1-13) grupisana u 4 antigena situsa (A, B, C, D) (28).

Glikoprotein E<sup>ms</sup> je N-glikolizovan dimerični protein molekulske mase oko 97 kDa, pri čemu oko 50% molekulske mase zrelog glikoproteina čine ugljeni hidrati. U okviru familije *Flaviviridae* E<sup>ms</sup> je utvrđen samo u rodu *Pestivirus*. Predstavlja multifunkcionalni protein: ima neurotoksično i antihelminsko dejstvo i enzimsku (ribonukleaznu, RNKaznu) aktivnost. Enzimska aktivnost je jedinstvena karakteristika za površinski protein virusa i njegova biološka funkcija nije u potpunosti razjašnjena (64). Smatra se da je RNKazna aktivnost determinanta virulencije virusa KKS (28) i ima ulogu u regulaciji sinteze RNK u inficiranim ćelijama i slabljenju imunološke odbrane organizma u ranoj fazi infekcije. Glikoprotein E<sup>ms</sup> ima ulogu u nastanku perzistentne infekcije, indukuje apoptozu limfocita, imunosupresiju i suštinski je značajan za patogenost virusa (9). Nije utvrđen način na koji ekstracelularni protein E<sup>ms</sup> ulazi u ćeliju ali se nalazi na površini inficiranih ćelija i u samoj ćeliji (28). Definisana je antigena arhitektura proteina E<sup>ms</sup> odgovorna za stimulaciju imunološkog odgovora i identifikovani su imunodominantni antigeni regioni (AR1, AR2 i AR3) koji predstavljaju metu za specifična antitela. Antigeni regioni AR2 i AR3 su specifični za infekciju virusom KKS (56).

Funkcija transmembranoznog glikoproteina E1 je manje proučena ali je utvrđena uloga u virulenciji, vezivanju i ulasku virusa u ćeliju. Protein p7 ima dve forme (E2-p7 i p7) u inficiranim ćelijama i zrelih virionima (28). Predstavlja esencijalni protein za



produkciju infektivnog virusa (64). Protein NS2 ima funkciju u autoproteolitičkom razdvajanju i proteaza nezavisnu funkciju u nastanku infektivne partikule. Protein NS3 je serin proteaza i njegova aktivnost je esencijalna za replikaciju virusa (28). NS4A ima funkciju kofaktora aktivnosti serin proteinaze dok su NS4B i NS5A komponente replikaze. NS5A ima ulogu u replikaciji genoma dok je NS5B virusna RNK-zavisna polimeraza (64).

Glikoprotein E2 je veličine 55 kDa, pri čemu polovinu molekulske mase čine ugljeni hidrati. Predstavlja glavni i najimunogeniji protein virusa KKS i odgovoran je za indukciju zaštitnog imunološkog odgovora (28). Na proteinu E2 se nalaze konzervirani neutralizacioni epitopi i on predstavlja ciljni protein za specifična antitela protiv virusa KKS (38). Na N-terminalnom kraju E2 proteina, koji predstavlja najimunogeniji region, nalaze se 4 antigena domena (A, B, C, D, sa 3 subdomena na domenu A), u formi dve nezavisne antigene jedinice. Jedna antigena jedinica obuhvata domene B i C (jedinica B/C) i druga domene A i D. U opisanom modelu antigene strukture domeni B, C i subdomen A1 sadrže neutralizacione epitope (9). Domen A je imunodominantan, antigeno konzervisan među pestivirusima (48) dok je subdomen A1 utvrđen u svim proučavanim sojevima i potvrda je identiteta virusa KKS (59). Najveći broj specifičnih antitela nakon infekcije virusom KKS su usmerena na domen B/C i A. Na A/D domenu utvrđena je antigena sekvenca koja predstavlja visoko konzervirani epitop (WH303) među sojevima virusa KKS ali ne i među pestivirusima. Slična antigena struktura pestivirusa je na BC jedinici, na osnovu čega je virus KKS srodan sa drugim u okviru roda. Serokonverzija nakon infekcije svinja BDV ili BDVD može uticati na efikasnost vakcinacije protiv KKS, upravo zbog zajedničkih epitopa na BC domenu (mogućnost neutralizacije vakcinalnog soja virusa). Stoga, serološka dijagnostika bazirana na BC jedinici ima manju specifičnost u populaciji svinja sa visokom prevalencom BDV i/ili BVDV (28).

Poznavanje molekularnih mehanizama virulencije KKS je osnova savremenih atenuisanih vakcina. Zbog visoke imunogenosti, glikoprotein E2 se razmatra kao tzv. „vruća tačka“ u razvoju vakcina. Postignut je značajan napredak u proučavanju virusa KKS ali i dalje postoje otvorena pitanja npr. molekularni markeri virulencije, funkcionalna uloga nestrukturanih proteina (3).

### **Prirodni domaćin**

U prirodnim uslovima, domaća i divlja svinja je jedina životinjska vrsta koja se inficira virusom KKS (88). Na suprot tome, svinje se mogu inficirati skoro svim članovima roda *Pestivirus* (99). Pestivirusi su antigeno i genetski srodni (35) i rod je diferenciran na osnovu sekvenci fragmenta 5'-UTR. Infekcija jednim virusom indukuje, u različitom stepenu, sintezu specifičnih antitela koja serološki unakrsno reaguju sa drugim članovima roda (40). Na nivou genoma između virusa KKS i BVDV utvrđena je homologija nukleotidnih sekvenci oko 66% dok je ista na aminokiselinskom nivou oko 85% (88).

### **Kulturalne osobine**

Virus KKS se umnožava u kulturi tkiva svinjskih bubrega, od kojih se ćelijske linije PK-15 („porcine kidney“) (45) i SK-6 („swine kidney“) najčešće koriste. Virus ne dovodi do razvoja citopatogenog efekta i replikuje se u citoplazmi ćelija. Antigen virusa u kulturi tkiva se može ustanoviti najranije 4 sata posle infekcije, i za 5-6 časova oslobađaju se prvi potomci virusa. Virus se širi putem medijuma, direktno sa ćelije na ćeliju preko citoplazmatičnih mostova i sa majke ćelije na ćerku ćeliju tokom mitoze. Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da virus sazreva u intracitoplazmatičnim vezikulama i najverovatnije se oslobađa egzocitozom vezikula okruženih membranom, koje sadrže virus (88).

U rodu *Pestivirus* razlikuju se citopatogeni (cp) i necitopatogeni (non-cp) biotipovi virusa na osnovu osobine da uzrokuju citopatogeni efekat (CPE) u kulturi tkiva. Virus KKS je non-cp i CPE određenih izolata se pripisuje postojanju defektivnih interferirajućih partikula (62) koje sadrže subgenomsku RNK odgovornu za CPE. Nije utvrđeno da li se virulencija cp-virusa razlikuje od non-cp virusa niti korelacija između CPE i virulencije *in vivo* (60). Svi cp izolati virusa predstavljaju pomoćne virus - zavisne subgenome kojima nedostaje region genoma koji kodira E proteine, N<sup>pro</sup>, p7 i NS2 (6).

## **Sojevi virusa**

Na osnovu virulencije, sojevi virusa KKS su klasifikovani kao visoko, srednje, slabo virulentni i avirulentni (77). Klasifikacija sojeva virusa po virulenciji je izvršena na osnovu kliničko-patoloških karakteristika infekcije (33) i epizootioloških zapažanja na inficiranim farmama (31). Utvrđene su razlike u količini virusa oslobođenog u medijum kulture tkiva između virulentnog i atenuisanog soja virusa (60). Sa kliničkog aspekta, virulencija je relativan pojam (17) i isti virus može izazvati različit tok KKS zavisno od uzrasta i imunološkog statusa organizma (62). Veštački atenuisani sojevi virusa (laboratorijski artefakti) su dobijeni pasažom u kulturama tkiva i/ili laboratorijskim životinjama i koriste u proizvodnji vakcina (npr. lapinizirani virus KKS) (89).

Smatra se da su danas na terenu prisutni slabo i srednje virulentni, dok su u prošlosti dominirali virulentni sojevi virusa KKS. Iako nije sasvim jasno kako je došlo do navedene dominacije, smatra se da je to posledica primene sero-profilakse u prošlosti i pasaže virusa kroz organizam svinja različitog imunološkog statusa, što je pružilo povoljne uslove za mutaciju (41). Virus KKS je prvobitno razmatran kao monotipičan ali su primenom monoklonskih antitela utvrđene antigene varijacije patogenosti i imunogenosti različitih sojeva (59). Virulencija određenog soja virusa KKS se najbolje određuje eksperimentalnom infekcijom svinja ali je neophodna i harmonizacija eksperimentalnih uslova (88).

## **Otpornost virusa KKS**

Virus KKS je umereno odnosno srednje osetljiv na faktore spoljašnje sredine, kao i drugi virusi sa omotačem ali može preživeti duži vremeski period u povoljnom ambijentu tj. u hladnoj, vlažnoj sredini, bogatom proteinima (29). Virus može preživeti mesecima ukoliko se meso skladišti ohladjeno (85 dana) i godinama ukoliko se zamrzne (duže od 4 godine) (16). Procesi konzervisanja svinjskog mesa, uključujući soljenje i dimljenje, ne inaktiviraju virus u muskulaturi (11) i on može preživeti mesecima u usoljenom, dimljenom mesu (29). Ambijentalna temperatura i koncentracija vodonikovih jona (pH) su parametri koji određuju poluživot virusa KKS. Virus se inaktivira na temperaturi 65 °C tokom 30 minuta (67). U tečnosti kulture tkiva virus KKS se inaktivira za 60 minuta na 56 °C ili 10 minuta na 60 °C, dok u defibriranoj krvi

infektivnost ne gubi za 60 minuta na 64 °C ili za 30 minuta na 68 °C (88). Virus je stabilan u širokom opsegu pH, ali se brzo inaktivira na pH ispod 4 i iznad 11. Lako se inaktivira toplotom, deterdžentima i dezinficijensima, uključujući tu dezinficijense na bazi hlora, fenole, kvaternarna amonijumova jedinjenja i aldehide (formaldehid, glutaraldehid) (29). S obzirom na to da virusni omotač sadrži lipide, lipidni rastvarači (etar, saponini, masna soda, persirćetna kiselina) ga brzo inaktiviraju. Međutim, otpornost virusa na fizičke i hemijske tretmane zavisi i od fizičkog stanja materijala u kom se nalazi. Jednoprocentni rastvor natrijum hidroksida se smatra najpogodnijim za dezinfekciju kontaminiranih objekata (88).

Stabilnost sojeva virusa se razlikuje pa je i gubitak infektivnosti u ambijentalnim uslovima od značaja u kontroli KKS. U proceni rizika prenošenja različitim putevima i poboljšanju kontrolnih mera, značajno je poznavanje preživljavanja virusa. Eksperimentalno, postignuti su različiti rezultati vremenskog preživljavanja virusa u ambijentu (94). Edwards (2000) smatra da na ambijentalnoj temperaturi virus KKS može preživeti nekoliko nedelja dok Artois et al. (2002) navode da se u ambijentu van organizma domaćina (oborima, đubretu) virus inaktivira za par dana.

### **2.3. EPIZOOTIOLOGIJA KLASIČNE KUGE SVINJA**

---

Na epizootologiju KKS utiče veliki broj različitih faktora: struktura i gustina populacije svinja, veličina i tip farmi, standardi uzgoja svinja, promet, cena svinja i svinjskog mesa, virulencija virusa, mere kontrole i eradikacije, program imunoprofilakse i metode laboratorijske dijagnostike (88). Faktori u epizootologiji KKS su i mehanizmi održavanja infekcije: divlje svinje, sindrom krmače kliconoše i perzistentno inficirana prasada (34). Glavni način infekcije u terenskim uslovima je oronazalni, direktnim ili indirektnim kontaktom sa inficiranom jedinkom ili putem kontaminirane hrane (62). Poznavanje faktora koji uvećavaju rizik unošenja virusa omogućava preduzimanje epizootiološki i ekonomski prihvatljivih preventivnih mera (16).

#### **Putevi prenošenja virusa**

Putevi prenošenja virusa KKS mogu biti direktni (horizontalno i vertikalno prenošenje) i indirektni (uključen jedan ili više intermedijarnih činilaca) (72).

#### **Horizontalno prenošenje**

Inficirana svinja je najvažniji rezervoar virusa i direktni kontakt je najefikasniji put prenošenja virusa KKS (95). Prenošnje počinje izlučivanjem virusa iz inficiranog organizma sekretima i ekskretima (62). Na prenošenje i količinu izlučenog virusa KKS utiče virulencija soja virusa, tok bolesti (72), intenzitet i učestalost kontakta inficirane i prijemčive jedinke. Kod direktnog kontakta, ambijentalna stabilnost virusa nema uticaj na prenošenje. Oronazalni sekret ima najveći značaj u kontaktnoj infekciji jer instinktivno ponašanje svinja podrazumeva oralno i nazalno istraživanje ambijenta (98). Direktni kontakt sa krvi je značajan ali je uslovljen ponašanjem svinja (tuča, kanibalizam) (94). Hronično inficirane svinje i perzistentno inficirana prasada kontinuirano izlučuju velike količine virusa i igraju ključnu ulogu u širenju KKS (95). Pored prenošenja unutar zapata, direktno prenošenje virusa se odigrava između zapata, ukoliko se inficirana svinja uvede u prijemčivi zapat ili inficirana i prijemčiva jedinka ostvare direktni kontakt tokom transporta (72). Pokazatelj prenošenja virusa je reproduktivni odnos ( $R_0$ ) definisan kao prosečan broj sekundarnih slučajeva infekcije

koje je prouzrokovala inficirana jedinka tokom infektivnog perioda u punoprijemljivoj populaciji. Vrednost  $R_0$  zavisi od infektivnosti i prijemčivosti jedinki u kontaktu i verovatnoće međusobnog kontakta. Ukoliko je vrednost manja od 1, infekcija se gasi; ukoliko je veća od 1 inficiran je veliki broj životinja i KKS se širi (89). Direktno prenošenje virusa ima najveći značaj u periodu pre ustanovljavanja prvog inficiranog zapata (period visokog rizika) (72).

### **Promet svinja**

Promet i trgovina svinjama su najčešći putevi širenja virusa KKS (88). Najznačajniji je promet zalučene prasadi sa različitih farmi, koja se mešaju i regrupišu na pijacama i vašarima i distribuiraju na farme za tov. Transporti na veće udaljenosti, mogu imati za rezultat nastanak žarišta za koje se teško može ustanoviti primarni izvor zaraze (62). Često se promet primarno odvija na stočnim pijacama i svinje se transportuju na više pijaca dok se ne prodaju, što uvećava verovatnoću širenja KKS. Značajan faktor u epizootiologiji KKS je i cena svinjskog mesa, koja utiče na promet i promenu strukture u populaciji svinja. Promet živih svinja i svinjskog mesa je zakonom zabranjen u zaraženom i ugroženom području. Međutim, kada padne cena svinjskog mesa, vrši se krijumčarenje živih svinja i mesnih prerađevina (63). Sa druge strane, rast cene svinjskog mesa dovodi do porasta interesa za zalučenim prasadima i stimuliše proizvodnju prasadi, uvećanje prometa živih svinja i širenja KKS (88). U državama slobodnim od KKS, zabranjen je uvoz svinja, svinjskog mesa i proizvoda iz država gde je prisutna KKS i koje sprovode imunoprofilaksu atenuisanim vakcinama (62). Širenje KKS iz inficiranog u slobodno područje ukazuje na neuspeh kontrole prometa (34).

### **Vertikalno prenošenje**

Najveći epizootiološki problem su infekcije virusom KKS koje perzistiraju kroz gestaciju jer su klinički inaparentne i omogućavaju prenošenje virusa sa krmače na potomstvo (intrauterina infekcija) (21). Uloga krmače kao izvora infekcije je višestruka: virus se nalazi u placenti i velike količine se izlučuju plodovom vodom na prašenju. Perzistentno inficirana prasad permanentno izlučuju virus u spoljnu sredinu 4-6 meseci bez znakova oboljenja ili imunološkog odgovora (88). Opisani fenomen se naziva sindrom krmače kliconoše („Carrier sow syndrome“) i može biti uzrok perzistentnog

žarišta infekcije (72). Prometom perzistentno inficirane prasadi infekcija se prenosi na druge farme. Kada se virus unese u vakcinisanu (ali nikad 100% zaštićenu) populaciju, nastaju nova žarišta infekcije. Verovatnoća prašenja prasadi kliconoša na vakcinisanoj farmi je za 50% manja u poređenju sa nevakcinisanom farmom (21). Hronične i perzistentne infekcije uzrokovane slabo virulentnim sojevima predstavljaju glavni mehanizam kruženja virusa (88).

### **Indirektno prenošenje virusa**

Razlikuje se indirektno prenošenje virusa zavisno od udaljenosti i nezavisno od udaljenosti, na osnovu činjenice da verovatnoća sekundarnih infekcija opada uvećanjem udaljenosti od inficiranog zapata (72). Druga razlika je na osnovu intermedijarnih vektora, koji mogu biti biološki (aktivna multiplikacija i izlučivanje virusa) ili mehanički, kada ekskreti i sekreti inficiranih svinja kontaminiraju vektore i kontaktom sa prijemčivim jedinkama prenose virus (73). Indirektno prenošenje virusa KKS je značajno u kratkom vremenskom periodu nakon inicijalne kontaminacije vektora (95) jer na preživljavanje virusa van organizma domaćina utiču brojni faktori: početna količina virusa, temperatura, pH, vlažnost, prisustvo organskih materija, izloženost hemijskim sredstvima i soj virusa KKS (94). Indirektni putevi prenošenja virusa imaju ulogu u širenju KKS, kako pre tako i nakon primene mera ograničenja prometa (73).

### **Divlje svinje**

Divlje svinje su rezervoar virusa i izvor infekcije za populaciju domaćih svinja (1). Brojčano, populacija divljih svinja je u okviru država članica EU procenjena između 800,000 i 1 milion, ali je gustina varijabilna zavisno od područja i države (36). Pri takvoj brojnosti, izlov u cilju umanjenja populacije je neuspešan ili kontraproduktivan ukoliko nije usmeren na mlade jedinke (66). U državama centralne i istočne Evrope broj divljih svinja je procenjen na oko 500,000 (6). Najčešći put unosa virusa u populaciju divljih svinja je ishrana pomijama (kontaminirana hrana) (61), kontakt sa kontaminiranim prevoznim sredstvima, inficiranim domaćim svinjama (62). U određenim regionima Evrope populacija divljih svinja je enzooski inficirana i predstavlja permanentni rezervoar virusa KKS (npr. Sardinija) (1). Značaj divljih svinja kao izvora infekcije se može sagledati iz činjenice da se 59% primarnih žarišta kod domaćih svinja u Nemačkoj (1993-1998. godina) dovodi u vezu sa direktnim ili

indirektnim kontaktom sa divljim svinjama (36). Od inficiranih divljih svinja virus se direktnim i indirektnim kontaktom prenosi na domaće svinje (6). Direktnim kontaktom virus se širi u uslovima pašnog (šumskog) ili poluotvorenog uzgoja domaćih svinja (66), kontaktom sa leševima inficiranih uginulih i odstreljenih divljih svinja (67). Virus se prenosi na domaće svinje indirektnim kontaktom sa kontaminiranom lovačkom opremom i vozilima za transport trupova (72) kao i ishranom otpacima poreklom od divljih svinja (42). Meso inficiranih divljih svinja je značajan izvor infekcije u uslovima kada nema kontrole trupova izlovljenih životinja (97). Značaj mesa inficiranih divljih svinja u širenju KKS se sagledava na primeru Austrije, kada je 1993. godine u uzorcima mesa divljih svinja uvezenog iz Kine i Rumunije utvrđen virus KKS (72). Izvor virusa mogu biti perzistentno inficirana prasada ali se smatra da ona ne igraju ključnu ulogu u širenju KKS divljih svinja (44).

### **Veštačko osemenjavanje**

Virus KKS se može uneti u zapat svinja kontaminiranim semenom nerastova. Klinički znaci KKS odraslih jedinki mogu biti slabo izraženi, što otežava dijagnostiku. Dodatni problem je mešanje ejakulata različitih nerastova čime se uvećava broj potencijalno ugroženih krmača (72). Tokom epizootije u Holandiji utvrđeno je da su 2 centra za veštačko osemenjavanje (VO) inficirana i od 1680 farmi koje su snabdevane potencijalno kontaminiranim semenom, na 36 je utvrđena infekcija (82). Seme nerastova je predmet prometa u svetu i značajna je stalna kontrola reprocentara. U područjima gde su inficirane divlje svinje, kontrola nerastova se vrši do 40 dana nakon uzorkovanja sperme, u cilju potvrde da nisu u periodu inkubacije (8).

### **Ishrana pomijama**

Ishrana pomijama je drugi po značaju uzrok infekcije virusom KKS u populaciji domaćih svinja (36). Proizvodnjom ili uvozom kontaminiranih mesnih proizvoda virus ulazi u lanac ljudske ishrane (66). Prijemčive svinje dolaze u kontakt sa virusom KKS ukoliko se hrane termički netretiranim otpacima iz klanica ili kuhinja, dobijenih klanjem inficiranih svinja. Najveći broj primarnih žarišta KKS (23%) u Nemačkoj u periodu 1993-1998. godine je prouzrokovan ilegalnom ishranom pomijama (36). U Meksiku je utvrđeno da 87% radnika donosi hranu na farmu, uključujući proizvode od svinjskog mesa koje mogu sadržati virus KKS (63). Smatra se da se na godišnjem nivou oko 100 kg inficiranog svinjskog mesa unese ilegalnim prometom iz država istočne



Evrope ili Azije u Dansku (8). Pri tome, 1 gram svinjskog mesa sadrži 8000 ID<sub>50</sub> (infektivnih doza). U Evropskoj uniji (EU) i većini evropskih država zabranjena je ishrana svinja pomijama (72).

### **Transportna vozila**

Transportna vozila kontaminirana ekskretima i sekretima inficiranih svinja su značajan put prenošenja virusa KKS (72). Tokom epizootije KKS 1997-1998. godine u Holandiji je utvrđeno da je infekcija uneta kontaminiranim kamionom, koji je prethodno transportovao zalučenu prasid u Nemačku (67). U daljem toku, kontaminiranim transportnim vozilima KKS se proširila iz Holandije u Belgiju (82). Eksperimentalno je ispitivano prenošenje virusa KKS kontaminiranim ambijentom na početku infekcije (pre pojave kliničkih simptoma). Objekti gde su boravile inficirane svinje, 15 dana posle infekcije (dpi) su iseljeni i bez čišćenja naseljeni prijemčivim jedinkama. Prenošnje KKS na prijemčive svinje se nije odigralo usled kratkog intervala između infekcije i depopulacije odnosno inficirane svinje nisu izlučivale dovoljno virusa za kontaminaciju ambijenta. Scenario odgovara situaciji kada se istim transportnim sredstvom prevoze svinje istog dana. U kasnijem toku infekcije, kada su izraženi klinički znaci KKS, prenošenje virusa kontaminiranim ambijentom je moguće (72). Prilikom ulaska u Dansku od transportnih vozila za životinje se zahteva čišćenje i pranje, dezinfekcija i karantin 48 sati (8). Zakonom u EU je propisano da neprekidni transport svinja traje do 8 sati, iz razloga dobrobiti životinja. Međutim, odmor životinja u specijalnim objektima omogućava kontakt prijemčivih i inficiranih jedinki u inkubaciji (80). Klanice mogu biti izvor virusa KKS jer se tu dopremaju svinje iz različitih područja i viremične svinje kontaminiraju objekte depoa. Utovar i istovar svinja treba da se vrši u izdvojenom delu, uz mehaničko čišćenje i dezinfekciju transportnih vozila (63).

### **Čovek**

U prenošenju virusa KKS čovek često ima centralnu ulogu (67), naročito u područjima sa velikom gustinom populacije svinja (73). Posetioci, farmeri, veterinari, tehničari mogu prenositi virus pasivno, kontaminiranom odećom, obućom, instrumentima i lekovima za parenteralnu primenu (88). Prenošnje virusa kontaminiranom odećom je eksperimentalno ispitivano u najgorem mogućem scenariju tj. obilazak inficiranih zatim prijemčivih svinja bez presvlačenja. Zaključeno je da je bez primene higijenskih mera prenošenje moguće dok je primenom osnovnih

higijenskih mera, rizik od prenošenja ograničen (49). Nošenje iste zaštitne odeće, obuće i izostanak dezinfekcije nakon obilaska inficiranih svinja su nesvakidašnji postupci (73). Radnicima pored čiste odeće i obuće, treba obezbediti tuširanje pre ulaska i pri izlasku sa farme. U prošlosti je opisano jatrogeno prenošenje virusa KKS vakcinacijom ili lečenjem. Ukoliko se ne menja brizgalica i igla, bočice sa vakcinom, antibioticima i drugim lekovima se mogu kontaminirati virusom. Tada se infekcija u zapatu širi rutinskim profilaktičkim merama npr. inokulacija gvožđa prasadima. Pored toga, problem je i nelegalni rad, npr. u Meksiku je utvrđeno da 82% radnika na farmama poseduje ili leče svinje u mestu stanovanja nakon radnog vremena (63).

### **Stajnjak**

Nisu utvrđene vrednosti virusa KKS u osoki koje su dovoljne za infekciju ali se ne može tvrditi da inaktivacija ispod detektabilnih vrednosti istu prevenira (85). Nakon izbijanja KKS primenjuju se odgovarajuća ograničenja npr. skladištenje osoke duži vremenski period (42 dana u EU) ili tretman osoke (94). Svinjska osoka ima alkalni pH (7.5 - 8) i sadrži amonijak u formi nejonizvanih molekula ( $\text{NH}_3$ ) koji ima virulicidno dejstvo. Zagrevanje osoke uvećava količinu  $\text{NH}_3$  i temperatura potrebna za inaktivaciju virusa KKS iznosi 65 °C. U osoki se može naći određena količina krvi ali je malo verovatno da prelazi 1% ukupnog volumena (85). Eksperimentalno je ispitivano vreme preživljavanja virusa u fecesu i urinu svinja inficiranih visoko i srednje virulentnim sojem virusa KKS, pri različitim vrednostima ambijentalne temperature. Virus KKS se inaktiviše u osoki za 14 dana, u fecesu za 3 dana (srednje virulentan soj) ili 5 dana (visoko virulentni soj) na temperaturi 20 °C. Visoko virulentni sojevi virusa su otporniji na inaktivaciju u fecesu i urinu u poređenju sa srednje virulentnim. Feces i urin svinja inficiranih visoko virulentnim virusom sadrži veće količine krvi u kojoj se nalaze inficirane ćelije, što pogoduje preživljavanju virusa u spoljašnjoj sredini. U uslovima nižih temperatura, vreme preživljavanja virusa se produžava i inaktivacija je brža u urinu nego u fecesu (94). Virus KKS može da preživi preko 6 nedelja na temperaturi 5 °C (29).

### **Preživari**

Pestivirusi (KKS, BVDV, BDV) inficiraju samo *Artiodactylae* i svaki od pobrojanih virusa inficira određenu životinjsku vrstu (svinje, goveda, mali preživari) ali je moguće prenošenje pestivirusa na drugu vrstu (npr. sa goveda na svinje).

Eksperimentalno, moguća je inokulacija virusa KKS kozama, ovcama i govedima (61) ali su infekcije supkliničke i ne postoji rizik širenja virusa (72).

### **Psi, mačke, glodari i ptice**

Putevi širenja koji obuhvataju mehaničke vektore: kućne ljubimce, glodare i ptice su od malog značaja za unošenje virusa u region, jer isti prenose na male udaljenosti (16). Eksperimentalno je utvrđeno da psi, mačke i glodari (pacovi) nisu biološki rezervoari (22) ali je moguće mehaničko prenošenje virusa (93). Lovački psi u enzootski zaraženim regionima kontaktom sa krvi viremičnih divljih svinja mogu preneti virus pasivno na koži i krznu u ograničenom vremenskom periodu (72). Preporučuje se period 8 dana odmora za lovne pse nakon aktivnosti u inficiranom području pre ponovnog lova (42). Eksperimentalno pacovi su hranjeni u kontaktu sa inficiranim svinjama i nakon toga stavljeni u direktan kontakt sa prijemčivim svinjama i nije utvrđeno prenošenje virusa (88). Različite vrste ptica su eksperimentalno inokulisane virusom KKS ali nije utvrđena replikacija i izlučivanje virusa, što je očekivan nalaz jer nisu prirodni domaćini. Smatra se da se virus inaktiviše pasažom kroz gastrointestinalni trakt ptica (42). Predatori i ptice strvinari mogu imati ulogu u pasivnom prenošenju virusa putem plena (72).

### **Artropode**

Istraživanja usmerena na proučavanje uloge artropoda u prenošenju virusa KKS polaze od pretpostavke da su ekskreti i sekreti inficiranih svinja kontagiozni i da artropode mogu biti mehanički vektori (72). Replikacija virusa u artropodima nije dokazana i uloga je ograničena na mehaničku diseminaciju virusa hematofagnim artropodama (vrste *Musca*, *Stomoxys*, *Tabanus* i *Aedes*) na malim udaljenostima. Depopulacija farme stimuliše rezidentnu populaciju insekata na migraciju, što treba imati u vidu pri sprovođenju kontrolnih mera na inficiranoj farmi (88).

### **Aerogeno prenošenje virusa KKS**

Eksperimentalno je utvrđeno aerogeno prenošenje virusa KKS na malim udaljenostima ali nije poznata maksimalna udaljenost na koju se virus širi (98). Infektivni aerosol nastaje izlučivanjem virusa izdahnutim vazduhom ili izlučivanjem i raspršivanjem sekreta i ekskreta (feces, urin, kijanje, kašljanje). Koncentracija virusa u

vazduhu je direktno proporcionalna jačini aerosolnog izvora i broju inficiranih jedinki. Virus i virusna RNK su utvrđeni u vazduhu prostorija gde su smeštene svinje inficirane visoko ili srednje virulentnim sojem virusa. Titar izolovanog virusa na kulturi tkiva je iznosio  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/m<sup>3</sup> (tissue culture infective dose) vazduha prostorije i utvrđen je do uginuća svinja (visoko virulentni soj) ili do kraja eksperimenta, 35 dpi (srednje virulentni soj). U uzorcima vazduha prostorije gde su bile smeštene jedinke inficirane slabo virulentnim sojem, nije utvrđen virus i virusna RNK, što je očekivano jer se izlučuju manje količine virusa (95). Veća brzina protoka vazduha deluje mehanički i pogoduje inaktivaciji virusa. Infektivni aerosol do  $10^{3.0}$  TCID<sub>50</sub>/m<sup>3</sup> produkuje grupa do 10 svinja pri čemu je količina emitovanog virusa u vazduhu po svinji na dan, približno  $10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>. Pod pretpostavkom da svinja od 25 kg u prostoriji udahne oko 15 l vazduha u minuti, ekspoziciona doza za 24 sata je približno  $10^{4.3}$  TCID<sub>50</sub>. Na osnovu ispitivanja minimalnih infektivnih intranazalnih doza za visoko virulentni soj, vrednosti su dovoljne za infekciju (98). Za kvantifikovanje aerogenog prenošenja, potrebni su dodatni podaci, npr. inaktivacija virusa u aerosolu i minimalna doza za aerogenu infekciju (96).

### **Infekcije iz neposrednog okruženja (susedstva)**

Infekcije iz susedstva su po definiciji sekundarna žarišta u zapatima lokalizovanim u neposrednoj blizini (1000 m) primarno inficiranog zapata pri nepoznatom putu infekcije (93). Infekcija iz susedstva ne predstavlja zaseban put i ubraja se u puteve prenošenja na malim udaljenostima (16). Veličina zapata predstavlja faktor rizika i uvećanjem broja prijemčivih svinja, uvećava se verovatnoća infekcije dok ista opada uvećanjem razdaljine od primarno inficiranog zapata (98). Širenje infekcije se umanjuje radijalnim uvećanjem udaljenosti od primarno inficiranog zapata (93). Infekcija se brže širi ukoliko u susedstvu inficiranog zapata ima goveda jer ona utiču na prisustvo i migratorno ponašanje vektora. Zapat u susedstvu je izložen virusu iz primarnog žarišta ali i sekundarna žarišta emituju virus (39). Tokom epizootije u Holandiji 1997-98. godine, 54% inficiranih zapata je ustanovljeno na udaljenosti 1 km od primarno inficiranog zapata (82). Nemogućnost razjašnjenja infekcija iz susedstva može biti posledica ne saopštavanja rizičnih kontakata ili puteva prenošenja koji se ne mogu pratiti (npr. ptice, kućni ljubimci, glodari) (93).

## 2.4. PATOGENEZA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

U prirodnim uslovima, svinje se inficiraju virusom KKS oronazalnim putem (88). Eksperimentalno infekcija je moguća parenteralnim putem, preko sluznica konjunktiva i genitalnog trakta, (62) i preko ledirane kože (88). Na širenje virusa u organizmu ne utiče put infekcije i virus se ubrzo nakon infekcije nalazi u ciljnom organu, tonzilama (84). Inficirana svinja je viremična i izlučuje virus (oronazalnim i lakrimalnim sekretom, urinom, fecesom i spermom) varijabilni vremenski period, uključujući i period inkubacije (29). Izlučivanje virusa se nastavlja do uginuća ili u slučaju kada jedinka preživi, do pojave specifičnih antitela (89). Na patogenezu i tok infekcije utiču virulencija virusa, karakteristike organizma domaćina (uzrast, individualne razlike, imunološki status) (32) i vreme infekcije (prenatalna ili postanatalna) (1). Mlade jedinke su prijemčivije na infekciju u odnosu na starije (89). Visoko virulentni sojevi se replikuju u visokom titru u većini organa. Eksperimentalno je nakon infekcije visoko virulentnim sojem utvrđeno izlučivanje koje je do 500 puta veće u poređenju sa srednje virulentnim sojem, iako infektivni period može biti kraći zbog uginuća. Nakon infekcije srednje virulentnim sojem titar virusa ima tendenciju nižih vrednosti (95), izlučuje se kontinuirano ili intermitentno (88) ali je veća količina ukupno izlučenog virusa (50 puta) u poređenju sa slabo virulentnim sojem. Zbog dugog infektivnog perioda, hronično inficirane svinje izlučuju do 40.000 puta više virusa u poređenju sa akutno inficiranim životinjama. Infekcija slabo virulentnim sojem virusa se karakteriše kratkim periodima umnožavanja virusa i izlučuju se najmanje količine virusa i to značajno manje u oronazalnoj tečnosti i očnim iscedku dok virus nije utvrđen u fecesu i urinu (95). Postanatalne infekcije slabo i srednje virulentnim sojevima virusa mogu uzrokovati stanje kliconoštva (88).

### **Patogeneza akutnog toka klasične kuge svinja**

U akutnom toku infekcije, zavisno od virulencije virusa i karakteristika organizma domaćina, širenje virusa u organizmu se obavlja u tri faze, odnosno razlikujemo limfatičnu, viremičnu i visceralnu fazu (88). Tonzile predstavljaju primarni ciljani organ i mesto replikacije virusa KKS (89). Virus je ustanovljen u tonzilama

najranije nakon 7 časova (84). Primarna replikacija virusa u tonzilama otpočinje između 7 i 48 časova posle infekcije i titar virusa ostaje na visokom nivou do 7 dpi. Nakon inicijalne replikacije u epitelnim ćelijama tonzilarnih kripti, virus se širi, putem limfatičnih sudova, u regionalne limfne čvorove, gde se može ustanoviti 16 časova posle infekcije. Tu se virus umnožava, dospeva do eferentnih krvnih kapilara i nastaje primarna viremija, 16-24 časa nakon infekcije. Tokom ove faze, virus dospeva u sekundarne ciljne organe (slezina, superficijalni i visceralni limfni čvorovi, bubrezi, kostna srž, solitarni limfoidni folikuli i Pajerove ploče u tankim crevima) (43) gde se replikuje, posle čega se razvija viremija visokog titra (84). Velike količine virusa se produkuju u sekundarnim ciljnim tkivima i kasno tokom viremične faze virus zahvata parenhimatozne organe, respiratorni trakt i centralni nervni sistem (CNS). Vreme završetka diseminacije virusa uglavnom zavisi od virulencije. Visoko virulentni sojevi virusa se mogu ustanoviti u većini organa 5-6 dpi (88). Utvrđivanje virusa u krvi je moguće od 3 do 6 dpi pa do uginuća (23). Međutim, saopšteni su i slučajevi utvrđivanja viremije između 6 i 10 dpi kod svinja sa blažim kliničkim oboljenjem (20). Infekcija srednje virulentnim sojem virusa je sličnog toka ali se odigrava sporije i titar virusa u krvi i organima ima niže vrednosti. Postnatalne infekcije slabo virulentnim sojevima virusa su uglavom ograničene na limfatičnu fazu, sa kratkom viremičnom fazom (88). Nakon infekcije svinja sa atenuisanim sojevima virusa KKS, replikacija je ograničena na inicijalnu limfatičnu fazu, ponekad praćena kratkom fazom viremije (14)

Virus ispoljava patogeni efekat na različite tipove ćelija, pri čemu su ciljne ćelije za umnožavanje virusa limforetikularne, epitelne i ćelije monocitno-makrofagnog sistema (m-Mos). U akutnom toku nastaju brojni poremećaji hemostaze. Oslobođanjem prokoagulantnih supstanci iz limfoidnog tkiva, endotelnih ćelija krvnih sudova i epitelnih ćelija gastrointestinalnog trakta dolazi do difuzne aktivacije sistema koagulacije. Posledica aktivacije koagulacionog sistema je potrošnja trombocita i pojedinih faktora koagulacije (konsuptivna koagulopatija). Morfološka manifestacija konsuptivne koagulopatije je diseminirana intravaskularna koagulacija sa pojavom mikrotromba u malim krvnim sudovima (84). Trombocitopenija, poremećaji u sintezi fibrinogena i degeneracija, nekroza i uvećanje permeabiliteta endotelnih ćelija su uzrok multipnih krvarenja u terminalnom stadijumu bolesti (45). Replikacija virusa u ćelijama

m-Mos indukuje oslobađanje citokina koji imaju ulogu u nastanku febre i krvarenja (66).

### **Hematološke promene tokom KKS**

Karakterističan hematološki nalaz je pojava leukopenije (2-4 dpi) koja se može ustanoviti pre prve febre i viremije (46). Trombocitopenija se ustanovljava već 2 dpi, istovremeno sa viremijom i febrom, i najizraženija je 6 dpi (84). Smatra se da je prisustvo antigena virusa u trombocitima posledica infekcije malog broja megakariocita (2-4%) i nije uzrok rane trombocitopenije. Morfološke i subcelularne promene trombocita odgovaraju promenama koje se ustanovljavaju nakon aplikacije medijatora agregacije trombocita iz makrofaga (71). Druge hematološke promene obuhvataju progresivno nestajanje eozinofilnih i bazofilnih granulocita, anemija sa anizocitozom, poikilocitozom, polihromazija (84).

### **Patogeneza hroničnog toka KKS**

Srednje i slabo virulentni sojevi virusa mogu dovesti do hroničnog toka kada se virus izlučuje kontinuirano ili intermitentno do uginuća (95). Hroničan tok karakteriše perzistentna viremija, oslabljen imunološki odgovor organizma i prisustvo virusa u svim sekretima i ekskretima (17). U hroničnom toku razlikuju se 3 faze bolesti. U prvoj akutnoj fazi, velike količine virusa se nalaze u krvi, retikuloendotelnim, limfoidnim i epitelnim tkivima. Drugu fazu karakteriše kliničko poboljšanje i titar virusa u krvi je mali ili ga nema. Umanjenje ili privremeno povlačenje virusa KKS iz krvi je rezultat sinteze antitela ili umanjenja broja ćelija iz kojih se oslobađa virus. Istovremeno prisustvo virusa i specifičnih antitela ima za posledicu deponovanje imunih kompleksa u bubrezima i nastanak mezangioproliferativnog glomerulonefritisa. U terminalnoj fazi bolesti, virus se ponovo širi po organizmu. Egzacerbacija je posledica imunološke iscrpljenosti koja nastaje kod inficiranih jedinki, koja doprinosi većoj osetljivosti na sekundarne bakterijske infekcije. Leukopenija se razvija u prvoj fazi, perzistira u drugoj i u terminalnoj fazi se javlja leukocitoza (88). Međutim, rezultati novijih istraživanja ukazuju da je u hroničnom toku, titar virusa konstantno visok bez prividnog oporavka, praćeno perzistentnom leukopenijom i sekundarnim bakterijskim infekcijama (95).

### **Perzistentna infekcija**

Razlikuju se dve forme perzistentnih infekcija: hroničan tok i kasna pojava bolesti. Intereakcija organizma domaćina i virusa određuje tok perzistentne infekcije pri čemu je uzrast kritični faktor u uspostavljanju iste: što je životinja mlađa, lakše se uspostavlja perzistencija virusa KKS. Dobna zavisnost se bazira na stepenu kompetentnosti imunološkog sistema i prenatalno perzistentna infekcija nastaje ukoliko se imunološki sistem eksponira virusu tokom faze imunološke tolerancije fetusa. Perzistentno inficirane jedinke ne sintetišu specifična antitela protiv virusa KKS, što doprinosi postojanju perzistentne viremije. Faktori odgovorni za pojavu kliničkog oboljenja nakon dugog inkubacionog perioda nisu poznati (88). Perzistentna infekcija sa izostanakom serokonverzije je utvrđena i postanatalno (17). Obolele jedinke imaju perzistentnu viremiju i imuni odgovor u vidu sinteze specifičnih antitela može biti odsutan, poremećen, zakasneo ili privremeno detektabilan. Slaba imunogenost virusa i/ili virusom indukovana imunosupresija može biti uzrok navedenog imunološkog odgovora (88).

### **Kongenitalna infekcija**

Ukoliko se suprasna krmača inficira slabo ili srednje virulentnim sojem virusa, infekcija prolazi nezapaženo ali se virus transplacentarno prenosi na fetuse (21). Ishod transplacentarne infekcije zavisi od stadijuma gestacije (razvojni uzrast fetusa) i virulencije virusa (17). Virus nalazi pogodne uslove za replikaciju u metabolički aktivnim ćelijama fetusa, razvija se viremija i distribucija antigena kod fetusa je slična postnatalnoj infekciji virulentnim sojem virusa. U ranoj fazi ontogeneze, virus utiče na diferencijaciju organa i dovodi do malformacija i embrionalnih uginuća. Svinjski fetusi postaju imunološki kompetentni sredinom gestacije, 60 - 70 dana i perzistentna infekcija nastaje infekcijom fetusa pre uspostavljanja imunokompetentnosti. Perzistentno *in utero* inficirana prasada su imunotolerantna na virus KKS i ne prepoznaju antigen virusa kao strani i ne sintetišu specifična antitela, pri čemu je imunološki odgovor na druge antigene očuvan (88). Eksperimentalno imunološka tolerancija je utvrđena infekcijom krmača virusom KKS pre 65 dana gestacije (84). Krmača koja nosi inficirane fetuse, tzv. krmača kliconoša može oprasiti naočigled zdravu prasadu, koja masecima izlučuje virus (14). Kod prasadi je prisutna viremija visokog titra u



prekolostralnom serumu, privremeno suprimirana kolostralnim antitelima. Perzistentno inficirano potomstvo oboli u uzrastu od nekoliko meseci (kasna pojava bolesti) i kada inficirano leglo uquine, moguća je supklinička infekcija druge prasadi, nakon gubitka kolostralnog imuniteta (88). Kod domaće prasadi je saopštena perzistentna viremija u trajanju do 11 meseci dok je kod divljih svinja utvrđeno preživljavanje perzistentno inficirane prasadi do 39 dana (20).

### **Patogeneza i imuni odgovor**

Virus se replikuje u velikom broju tkiva ali primarno zahvata imunološki sistem i ima imunosupresivno dejstvo (67). Mijeloidna populacija ćelija, monociti i makrofagi su ciljne ćelije za replikaciju virusa. Tokom infekcije makrofagi sintetišu i oslobađaju hemijske medijatore (proinflamatorne citokine), među kojima je dominantan tumor nekrotični faktor (TNF- $\alpha$ ), medijator apoptoze i imaju značajnu ulogu u patogenezi. Maksimalna sinteza TNF- $\alpha$  koincidira sa infekcijom i indukuje oslobađanje interleukina (IL-1) iz ćelija m-Mos, endotelnih i drugih mononuklearnih ćelija. Pojava citokina koincidira sa apoptozom limfocita, koja igra glavnu ulogu u diseminaciji virusa po organima. Umanjenjem broja leukocita i B ćelija u cirkulaciji, virus narušava imunološki odgovor inficiranih jedinki ali uprkos imunosupresiji u akutnom toku, dolazi do aktivacije i proliferacije B ćelija, vezano sa aktivacijom ćelija m-Mos, T-limfocita i oslobađanjem IL-2, IL-4, IL-6 i interferona-gama (INF- $\gamma$ ). Ove promene su odgovorne za inicijaciju humoralnog imunološkog odgovora ali zaštita je slaba (75). Ukoliko jedinka preživi i oporavi se od infekcije sintetišu se specifična antitela koja se ustanovljavaju najranije 11 dpi većinom posle 21 dpi (62). Sinteza specifičnih antitela nije od odlučujućeg značaja za oporavak jer i jedinke koje ih sintetišu uginu od KKS. Nakon infekcije virusom KKS može i izostati imunološki odgovor ili su specifična antitela povremeno detektabilna, što može biti posledica slabe imunogenosti soja virusa (88).

### **Pasivni (kolostralni) imunitet**

Zbog postojanja višeslojne placente (epiteliohorijalan tip) kod svinja izostaje transplacentarni transfer maternalnih antitela u fetalnu cirkulaciju (fiziološka agamaglobulinemija) i pasivni imunitet prasadi je u potpunosti postnatalan (51). Prase

se rađa bez imunoglobulina (Ig) delimično i zbog nepostojanja ekspozicije antigenu *in utero*.

Kolostrum predstavlja kompleksnu mešavinu nutrijenata, faktora rasta i Ig (74). Glavni imunoglobulini u kolostrumu su IgG (80%), sa manjom količinom IgA i IgM. Značajan deo Ig je poreklom iz seruma ali koncentracije u kolostrumu prevazilaze vrednosti u serumu krmače. Na suprot tome, u mleku dominira IgA, i najveća količina se sintetiše lokalno u mlečnoj žlezdi. U kolostrumu se nalaze i polimorfonuklearni leukociti, limfociti, makrofagi, epitelne ćelije kao i tripsin inhibitor koji delimično blokira degradaciju proteina u gornjem delu intestinuma praseta (68). Nisu utvrđene značajne razlike u visini titra antitela u mleku različitih četvrti vimena krmača i uticaj pojedinih četvrti na ukupnu koncentraciju Ig u kolostrumu je zanemarljiv (76). Smatra se da prvih 60 ml kolostruma određuje količinu i vrstu resorbovanih Ig (10). U postpartalnom periodu kolostrum se brzo menja u mleko, sa izmenom odnosa IgA:IgG od 0.16 na rođenju, do 0.32 za 24 sata, 0.33 za 48 sati, 1.78 petog dana i 2.22 od osmog dana. Promena izotopa Ig koincidira sa zatvaranjem crevne barijere i izmenom glavnog mesta aktivnosti kolostralnih antitela iz systemske cirkulacije u lumen creva. U serumu novorođene prasadi prisutne su niske vrednosti komplementa, koje se uvećavaju brže kod prasadi koja sisaju u poređenju sa veštački hranjenim, što ukazuje na kolostralni unos komplementa (68).

Sposobnost resorpcije Ig brzo opada tokom prvih sati nakon prašenja. Između 2 sata (duodenum) i 48 sati (ileum), epitel creva se menja (proces zatvaranja barijere) i onemogućuje transfer intaktnih molekula Ig kroz ćelijsku membranu. Unos kolostruma u prvih 3-6 sati života je od velikog značaja i prase koje se zadnje oprasi u velikom leglu ne dobije iste količine Ig kao ostale jedinke. Tanko crevo novorođenog praseta resorbuje makromolekule neselektivno celom dužinom ali maksimalno u srednjem delu. Enterociti tankog creva novorođene prasadi imaju karakteristični apikalni tubulovesikularni sistem membrana. Formacija vakuola u epitelnim ćelijama i transport Ig u plazmu zavisi od koncentracije proteina kojima je izložena intestinalna mukoza. Faktori koji utiču na zatvaranje barijere nisu u potpunosti razjašnjeni ali komponente kolostruma (laktoza, kolostralni tripsin inhibitor) (68) i koncentracije kortizola u peripartalnom periodu ubrzavaju proces. Kod prasadi komponente imunološkog sistema su prisutne pre rođenja. Na stepen zrelosti imunog sistema utiče ekspozicija

intestinalnoj mikroflori i antigenima hrane. Smatra se da je razvoj aktivnog imuniteta suprimiran kolostralnim IgG i nije tačno utvrđeno kada organizam praseta počinje sa sintezom sopstvenih IgG. Kod prasadi na sisi, sinteza IgG počinje između 7-21 dana života zavisno od resorbovanih kolostralnih IgG odnosno sinteza IgG je u korelaciji sa količinom IgG resorbovanim iz kolostruma (74). Titar antitela u kolostrumu je 2-4 puta veći u odnosu na vrednosti u serumu krmača u kratkom periodu pre prašenja, što je posledica efekta koncentracije. Brzina absorpcije kolostralnih antitela kod novorođene prasadi do dostizanja pika varira, 9-24 sata nakon sisanja. Rana pojava antitela kod novorođene prasadi ukazuje na rano uspostavljanje pasivnog imuniteta (52). Kolostralna antitela su najranije utvrđena u krvotoku novorođene prasadi prasadi 2 sata nakon sisanja kolostruma. Nakon 3 sata titar antitela je 1:16 i postepeno raste, sa maksimalnim vrednostima između 5 i 7 sati nakon prvog sisanja (51). Vrednost kolostralnih antitela opada sa uzrastom i inicijalne vrednosti variraju zavisno od titra antitela krmača. Nakon 24 sata prasad imaju antitela u serumu na približno istom nivou kao krmača majka i nije zabeležen rast nakon 48 sati (52). Kod 61.2% prasadi je utvrđena veća vrednost, kod 27.7% podjednaka i kod 11.1% niža vrednost titra antitela u odnosu na krmače pre prašenja. Najviša utvrđena vrednost titra je 1:128, koja opada u uzrastu 7 dana i u 8 nedelji života je ispod 1:8. Nedelju dana posle prašenja kod krmača je zabeležen dvostruki pad i nakon 3 nedelje porast titra antitela. Smatra se da je pad i ponovni skok titra antitela kod krmača nakon prašenja posledica hormonalnog delovanja (51). Poluživot kolostralnih antitela varira 6 do 14 - 17 dana i zavisi od programa vakcinacije krmače majke (91). Procena poluživota kolostralnih antitela je bazirana na osnovu koncentracija u serumu, ne uzimajući u obzir uvećanje volumena sa uvećanjem telesne mase, tako da je poluživot IgG duži (74). Kod perzistentno inficirane prasadi poluživot maternalnih antitela je kraći od 7 dana (1). Smatra se da titar kolostralnih antitela opada 5% na dan i u uzrastu 14 dana, izluči se oko 65% kolostralnih antitela. Pad titra antitela je konstantan unutar jednog legla ali se značajno razlikuje među leglima (10). Ekspozicija antigenima koje prepoznaju kolostralni IgG rezultira u njihovoj neutralizaciji (74). Maternalni imunitet pasivno štiti od oboljenja i mortaliteta nakon veštačke infekcije, što ukazuje na dominantnu ulogu antitela u imunitetu (4).

## 2. 5. KLINIČKA SLIKA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

Nakon infekcije virusom KKS razvijaju se brojni klinički simptomi i tok infekcije može varirati (89) od akutnog fatalnog oboljenja do supkliničkih formi sa konvalescencijom (17). Inkubacioni period bolesti varira 2-6 i do 14 dana (80), najčešće 7-10 dana (61). Tok i ishod infekcije zavisi od interakcije između virusa (infektivna doza i virulentnost datog soja) i faktora organizma domaćina (opšte stanje, uzrast, imunokompetentnost) (49). Na klinički tok bolesti utiče i prisustvo drugih patogena u organizmu. Mlade jedinke (prasad) obole u znatno težoj formi, sa izraženim hemoragičnim sindromom dok je kod odraslih jedinki moguć supklinički tok (45).

U zavisnosti od virulencije, među sojevima virusa KKS postoje razlike u pogledu replikacije virusa *in vivo* i njihove invazivnosti, usled čega se manifestuju različite kliničke forme oboljenja. Visoko virulentni sojevi virusa dovode do perakutnog ili akutnog toka bolesti, sa visokim morbiditetom i mortalitetom, bez obzira na uzrast (33). Srednje virulentni sojevi virusa dovode do supakutnog, hroničnog ili supkliničkog toka, sa uginućem ili oporavkom (77). Utvrđena je razlika u procentu preživljavanja različitih kategorija svinja nakon infekcije srednje virulentnim sojem virusa: zalučena prasad 32%, tovljenici 52% i krmače 86% (26). Nakon infekcije slabo virulentnim sojevima virusa jedinke mogu oboleti u hroničnom ili supkliničkom (inaparentnom) toku (95). Faktori organizma domaćina utiču na ishod infekcije slabo do srednje virulentnim sojevima dok su nakon infekcije visoko virulentnim sojem virusa KKS od malog značaja (88). U državama gde se ne vrši vakcinacija, populacija svinja je potpuno prijemčiva za infekciju i virulentnost virusa ima najveći uticaj na tok bolesti (45). Oboljenje može da protiče u akutnom, supakutnom, hroničnom, atipičnom, inaparentnom (supkliničkom) toku i kao kasna pojava bolesti (89).

**Perakutni tok** bolesti karakteriše brz tok bez pojave tipičnih kliničkih znakova koji bi ukazivali na KKS, sa iznenadnim uginućem (11). Obolele jedinke imaju povišenu telesnu temperaturu (41 °C) pre nego što uginu 2-5 dpi (84). Perakutni tok oboljenja se nalazi u neimunnoj populaciji svinja i karakteriše ga visok mortalitet (45).

U **akutnom toku** bolesti, klinički znaci predstavljaju posledicu nastalog septikemičnog oboljenja sa krvarenjima (45). Klinički akutni tok karakteriše teška anoreksija i depresija, visoka telesna temperatura (41 do i preko 42 °C). Prasad uzrasta do 12 nedelja obole sa izrazitom pireksijom (> 40 °C) (62) dok kod odraslih jedinki vrednost može biti i niža (39.5 °C) (92). Pireksija se ustanovljava već 2 - 4 dpi, pri čemu 4 - 8 dpi dostiže najviše vrednosti (11) i perzistira do pred uginuće, kada pada ispod normalnih vrednosti (88). U ranom stadijumu kod obolelih svinja se ustanovljava kataralni konjunktivitis sa pojavom iscedka, čijim isušivanjem nastaju kraste i pruge oko i ispod očiju, kao i slepljivanje očnih kapaka (45). Može se javiti i mukozni do purulentni nazalni iscedak (88). Konstipacija je prisutna u inicijalnom stadijumu infekcije, nakon čega sledi intermitentna profuzna dijareja (45) i ponekad ponovo konstipacija. Svinje mogu da povraćaju žućkastu tečnost (žuč). Od 2 do 6 dpi klinički znaci bolesti se pojačavaju (88). U tipičnim akutnim slučajevima oboljenja promene su vidljive na koži belih svinja. Prvobitne promene u vidu hiperemije kože su praćene petehijalnim ili opsežnim difuznim krvarenjem (11). Krvarenja na koži se zapažaju na ušnim školjkama, repu, abdomenu, iznad koštanih protuberancija i unutrašnjoj strani zadnjih ekstremiteta (62). Nekoliko sati pred uginuće može se zapaziti purpurna diskoloracija kože abdomena, rila, ušiju i medijalne strane ekstremiteta (45). Petehijalna krvarenja na koži su tipičan znak ali nisu uvek prisutna (61). Česta je i pojava žutice (*icterus*) (92).

Krvarenja po koži su praćena znacima poremećaja respiratornog i digestivnog trakta ili poremećaja funkcije centralnog nervnog sistema (CNS) (90). Neurološki znaci obuhvataju nekoordinisano kretanje, konvulzije sa silovitim pokretima nogu (62), cikličnim tremorom (90) i škripanjem zubima. Kako oboljenje napreduje, izražena je opšta slabost, svinje mršave i imaju karakterističan nesiguran teturav hod, naročito zadnjih nogu, nakon čega sledi posteriorna pareza. U terminalnom stadijumu bolesti svinje drhte i gomilaju se jedna pored ili preko druge u potrazi za toplotom (45). U daljem toku, paraliza zahvata zadnju trećinu tela sa tendencijom generalizacije, jedinke leže na boku, veslaju nogama (37). Zavisno od imunološkog statusa populacije i virulencije virusa, mortalitet može biti visok (90-100%) ili nizak (30-40%) (84). Opisan tok infekcije se označava i kao „klasičan“ sa uginućem 10-20 dpi (62).

Srednje virulentni sojevi virusa dovode do **supakutnog toka** bolesti. Klinički znaci su slabije izraženi, febra je prisutna 2 - 3 nedelje (40.5 - 41 °C), morbiditet i mortalitet je niži i uginuće nastupa 20 - 30 dpi (88). U prošlosti je dominirao akutni tok KKS, dok u zadnje vreme dominira supakutni i hronični tok (60) sa nespecifičnom kliničkim slikom, naročito u enzootski inficiranim regionima (78). Opisan je i atipičan tok sa slabo izraženim kliničkim znacima i niskim morbiditetom (32).

**Hroničan tok** se definiše kao oboljenje u trajanju od 30 i više dana. U hroničnom toku prevashodno su zahvaćeni pojedini organski sistemi i to: respiratorni, digestivni, CNS. Klinička slika je često nekarakteristična, zbog čega je ovaj tok često pogrešno označavan kao atipična KKS (84). Na osnovu izraženosti kliničkih simptoma oboljenja hronični tok se deli u tri faze: rana akutna reakcija, period kliničkog poboljšanja i povratak bolesti i uginuće (17). Inicijalna faza odgovara akutnom toku, ali je titar virusa u organizmu niži. Klinički je prisutna anoreksija, depresija, febra. Nakon nekoliko nedelja, sledi druga faza sa kliničkim poboljšanjem (45) i privremenim povlačenjem virusa iz seruma sa niskim vrednostima specifičnih antitela (17). U terminalnoj fazi dominiraju nespecifični klinički simptomi: intermitentna febra, viremija, anoreksija, alopecija, depresija, dijareja (hronični enteritis). Specifična antitela se privremeno detektuju u krvnom serumu, jer imunološki sistem otpočinje sa sintezom ali ne mogu eliminisati virus iz organizma. Posledično dolazi do neutralizacije antitela virusom koja ne mogu više da se dokažu (62). Zbog teških poremećaja u rastu i razvoju nastaju kržljavci, sa relativno velikom glavom i malim trupom, alopecijom i kožnim lezijama, koji zauzimaju stav sa izbočenim leđima i zadnjim ekstremitetima podvučenim pod telo (88). Posledica imunosupresivnog dejstva virusa su sekundarne bakterijske infekcije (44). Mortalitet je relativno nizak i svinje uginu 1-3 meseca nakon infekcije (45) ali mogu preživeti i do 100 dana (20).

Kod **divljih svinja** infekcija protiče u sličnom toku (7) ali su u kliničkoj manifestaciji KKS od značaja infekcije drugim patogenima (*Pasteurella multocida*, parazitske infestacije) (44). Krvarenja na koži se retko zapažaju jer su maskirana čekinjama (79). Divlje svinje imaju tendenciju da gube strah od čoveka i tumaraju po danu a češće se okupljaju oko pojila što je pokazatelj povišenja telesne temperature.

Često se uočava dijareja, slabost zadnjih nogu, tremor muskulature i posteriorna pareza (1).

### **Perzistentne i kongenitalne infekcije**

Perzistencija virusa ima za posledicu različite kliničke forme KKS: hroničan tok (prenatalna infekcija) i kasna pojava bolesti (kongenitalna infekcija). Moguće su i intermedijarne forme perzistentne infekcije (88). Slabo i srednje virulentni sojevi virusa KKS uzrokuju supkliničku infekciju suprasne krmače i transplacentarnu infekciju prasadi (11). Transplacentarna infekcija može imati za rezultat abortus, mumifikaciju ploda, prašenje mrtve prasadi, slabe i prasadi sa tremorom, neonatalna uginuća ili rođenje naočigled zdrave ali perzistentno inficirane prasadi (45). Kasnu pojavu bolesti karakteriše u početku dug period odsustva kliničkih simptoma kada prasadi izgledaju zdravo (84). Kliničku sliku karakteriše progresivna anoreksija i depresija, konjunktivitis, dermatitis, intermitentna dijareja, krčljanje i lokomotorni poremećaji sa posteriornom parezom. Telesna temperatura je u okviru normalnih vrednosti ili povišena. Prisutna je leukopenija, ali se u terminalnom stadijumu bolesti razvije leukocitoza (88). Kod određenog broja prasadi utvrđen je kongenitalni tremor (45). Učestale sekundarne infekcije komplikuju kliničku dijagnostiku KKS (90). Najveći broj prasadi preživi duže od 4 do 6 meseci ali najčešće uginu u starosti od 1 godine (62).

Diferencijalno dijagnostički u akutnom toku treba imati u vidu afričku kugu svinja, bakterijske septikemije (salmoneloza, pastereloza, crveni vetar) (82), *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS), *Morbus Aujeszky* (MA), cirkovirusne infekcije svinja (31), infekcije svinja drugim pestivirusima (BVDV, BDV) (80), trovanje svinja antikoagulansima (derivati kumarina) (45). Sumnja na KKS se postavlja kada nakon određenog vremenskog perioda enteralno ili respiratorno oboljenje sa febrom ne odgovara na antibiotski tretman. U diferencijalnoj dijagnostici hroničnog toka treba imati u vidu kongenitalne infekcije svinja sa BVDV, malnutriciju, enterotoksikozu i dizenteriju (62).

### **Klinička slika u enzootski inficiranim zaptima svinja**

Infekcija virusom KKS se može javiti i u vakcinisanim zaptima, kada se klinički znaci oboljenja najčešće pripisuju infekciji drugim patogenom. Sumnja na KKS se i ne postavlja jer se smatra da vakcinisane svinje ne mogu oboleti. Klinički su prisutni reproduktivni poremećaji (abortus), prašenje mumificirane i prasadi male težine, uvećanje mortaliteta, naročito prasadi 2 nedelje posle zalučjenja, nešto manje kod prasadi na sisi i tovljenika. Čest nalaz je veliki broj zakržljale prasadi dok su ređa iznenadna uginuća, febra, poremećaj funkcije CNS-a (veslanje nogama), profuzna salivacija, palpebralni edem, mukopurulentni očni iscedak i kašalj. Saopšteno je ciklično izbijanje KKS: mali broj svinja oboli, nakon čega sledi period bez kliničkih znakova. U vakcinisanim zaptima, virus pronalazi delimično imune i prijemčive jedinke koje su u tom slučaju rezervoari i izvor infekcije za širenje virusa. Uspostavlja se krug obolelih životinja koje se terapijski tretiraju i vakcinišu, što doprinosi širenju virusa i održavanju enzootske infekcije u vakcinisanom zaptu svinja. Mortalitet je nizak (10-20%) i retko se zvanično prijavljuje (63).

Klinička slika KKS se značajno izmenila pod pritiskom vakcinacije u enzootski inficiranim regionima, sa pojavom atipičnih i/ili hroničnih formi oboljenja (99) i inaparentnim tokom koji karakterišu niski morbiditet i perzistentna infekcija novorođene prasadi. Smatra se da se radi o trendu promene virulencije virusa (77).



## 2.6. PATOMORFOLOŠKE PROMENE

---

Patomorfološke promene KKS zavise od virulentnosti soja virusa, uzrasta (82) reaktivnosti organizma domaćina (39) i stadijuma bolesti. Oboljenje se karakteriše pojavom generalizovanih i petehijalnih krvarenja, infarktima na unutrašnjim organima a obuhvaćeni su nervni, respiratorni, digestivni i reproduktivni sistem (59).

U **perakutnom toku** KKS, svinje se mogu zateći iznenada mrtve i patomorfološki nalaz može biti negativan (45) ili se ustanove promene koje su posledica šoka, sa kongestijom i edemom pluća, kongestijom jetre. U perakutnom toku krvarenja najčešće izostaju (84).

Karakteristične patološke lezije u **akutnom toku** obuhvataju hemoragičnu dijatezu sa multipnim petehijalnim krvarenjima u većini organskih sistema i seroznim membranama (84). Spoljašnjim pregledom leša životinje uginule u akutnom toku tipičan nalaz je eritem, najizraženiji u predelu kože ušnih školjki i repa, koji mogu biti i plavičaste boje (cijanoza) (11). Na koži su vidljive petehije i ekhimoze kao i fokalna do koalescentna krvarenja sa dermalnim infarktima (79). Unutrašnjim pregledom petehije i ekhimoze se nalaze najčešće na limfnim čvorovima, bubrezima, ređe na srcu, seroznim i mukoznim membranama abdomena i grudnog koša (62), mokraćnoj bešici, intestinalnoj serozi i mukozi, larinksu, epiglotisu, koži i subkutisu (45). Sekundarne bakterijske infekcije intenziviraju i često modifikuju patološki nalaz (71). Petehije do ekhimoze su prisutne na površini bubrega, subkapsularno, ređe u meduli i u predelu hilusa (45). Krvarenja na bubrezima su karakterističan nalaz u akutnom i supakutnom toku, bez obzira na virulenciju soja virusa, ali soj utiče na intenzitet i vreme pojave. Bledi bubrezi sa petehijalnim krvarenjima (nalik na jaje ćurke) su od dijagnostičkog značaja (84). Petehije, ekhimoze ili sufuzije se ustanovljavaju i na mukozi mokraćne bešike (11).

Limfni čvorovi su uvećani (edem) sa perifernim ili difuznim krvarenjima različitog intenziteta, umereno crvene do skoro crne boje (11). Patogeneza hemoragične infiltracije limfnih čvorova nije u potpunosti rasvetljena. Tipični šaroliki izgled na

poprečnom preseku može biti posledica resorpcije krvi iz regionalnog krvarenja ili krvarenja unutar limfnog čvora (84). Krvarenja u perifernim sinusima limfnih čvorova daje im mermerni izgled (88).

Lezije u usnoj šupljini obuhvataju erozije i ulcere jezika, farinksa i tonzila. Promene na tonzilama mogu biti u vidu blage upale, koja se dalje razvija u nekrotični tonzilitis. Često se primarni tonzilitis komplikuje bakterijskom invazijom nekrotičnog tkiva (84) dovodeći do gnojnog (supurativnog) tonzilitisa (45). Tipičan nalaz su petehije na epiglotisu i larinksu (11). U digestivnom i respiratornom traktu prisutna je kataralna, fibrinozna i hemoragična inflamatorna reakcija (88). Nalaz u želucu karakteriše kongestija i krvarenja sluznice fundusa, ponekad sa erozijama (84). U tankim crevima je prisutan kataralni dok u uznapredovalom stadijumu dominira fibrinozni i difteroidni enteritis. Lezija koja se smatra patognomoničnom za supakutni tok je buton (ulkus), koji predstavlja sferični, oštro ograničen ulkus, nekoliko milimetara u dijametru (88). U ranoj fazi, lezija se zapaža kao malo nekrotično područje, nakon čega se formiraju koncentrični slojevi fibrinske i nekrotične mase, nastankom sekundarnih bakterijskih infekcija, promene postaju obimnije (11). Butoni su čest nalaz u protrahiranom toku bolesti (88). Smatra se da je buton posledica vazokonstrukcije ili okluzije arteriola usled otoka endotelnih ćelija, degeneracije vaskularnog zida i formiranja mikrotromba (84). Jetra obolelih svinja je tamne boje, uvećana (otok) i sa kongestijom. Ređi nalaz su infarkti na jetri usled tromboze interlobularnih krvnih sudova. Na mukozi žučne kese mogu se naći nekrotična područja nalik ulkusu (11). Promene u respiratornom sistemu obuhvataju kongestiju i intersticijalni edem pluća (84), zatim kataralnu do fibrinoznu bronhopneumoniju, infarkte i ekhimotična krvarenja na plućima (88). Sekundarne bakterijske infekcije maskiraju promene tipične za KKS (62).

Infarkti slezine se smatraju patognomoničnim za KKS. Mogu se ustanoviti već 4 dpi ali i nakon 8 dpi (71). Podeljena su mišljena o mehanizmu nastanka: poremećaj protoka krvi usled okluzije kapilara trombima (88) ili poremećaj protoka krvi u arterijskim krvnim sudovima (71). Infarkti su oštro ograničeni i uzdignuti, tamno crvene ili blede boje, mehurići nepravilnog oblika, različite veličine (84). Nalaze se kao pojedinačni ili u nizu koji koalescira i formira kontinuiranu graničnu ivicu infarkta duž

ruba i vrha slezine (45). Slezina je normalne veličine. U prošlosti je incidenca infarkta slezine bila 50-60% dok se u današnje vreme ređe ustanovljava (84).

Iako virus KKS nema izražen tropizam za CNS, čest nalaz je negnojni meningoencefalitis (62). U akutnom toku bolesti od 3 dpi utvrđena je hiperemija i od 9 dpi mikrokrvarenja u rostralnom delu telencefalona (37) i perivaskularno ćelijska infiltracija, proliferacija endotelnih ćelija, mikroglia i fokalna nekroza (45). Histopatološki nalaz na mozgu karakteriše negnojni meningoencefalitis sa teškim vaskulitisom (61) naročito u malom mozgu i kičmenoj moždini. Incidenca encefalitisa je 70-90%. Okularne lezije obuhvataju intraokularne inflamatorne promene, retinitis, uveitis i horioditis (84).

U **hroničnom protrahiranom toku** jedan sistem organa može biti dominantno zahvaćen sa sekundarnim bakterijskim infekcijama. Patomorfološke promene u digestivnom traktu obuhvataju difuzni difteroidno-nekrotični enteritis (11), nekroze i ulceracije na ileumu, ileocekalnoj valvuli i rektumu (62), ulceri butona u cekumu i proksimalnom kolonu (45). Zbog deponovanja imunih kompleksa u bubrezima, nastaju oštećenja glomerula (71) i razvija se mezangioproliferativni glomerulonefritis (88). U nalazu dominira limfadenozna (33), atrofija timusa i deplecija limfocita u perifernim limfoidnim tkivima. Lezije na rebrima obuhvataju nepravilno proširenje epifizne linije (egzostoze) na kostohondralnom spoju rebra usled poremećaja u metabolizmu kalcijuma i fosfora svinja u porastu (88) i kalcifikacije ćelija hrskavice (45). Može biti prisutna i nekroza kože (71) dok su krvarenja slabo izražena ili odsutna (84).

Histopatološke lezije obuhvataju parenhimatoznu degeneraciju limfnog tkiva, ćelijsku proliferaciju vaskularnog intersticijalnog tkiva i negnojni meningoencefalomijelitis (88). Mikrotromboza uzrokuje teška oštećenja endotela, dovodi do plazma dijapedeze i perivaskularnih krvarenja. Karakteristične makroskopske lezije kongestija, krvarenja, infarkti i nekroza su posledica promena u arteriolama, venulama i kapilarima. Vaskularne promene su najizraženije u limfnim čvorovima, slezini, bubrezima i digestivnom traktu (84).

U slučaju izbijanja KKS na farmi vakcinisanih svinja, ne ustanovljavaju se patološke promene karakteristične za KKS. Najčešći nalaz su mramorirani limfni čvorovi, petehijalna krvarenja na serozama, retko krvarenja na bubrežima i slezini, intestinalne i pulmonalne lezije koje patomorfološki odgovaraju salmonelozi i pneumoniji (63).

### **Teratogeno dejstvo virusa KKS**

Prenatalno, organizam svinja je veoma osetljiv na virus KKS, pri čemu su teratogeni efekti izraženiji ukoliko se infekcija odigra ranije u toku perioda gestacije (84). Transplacentarne infekcije tokom zadnjeg trimestra suprasnosti imaju za posledicu mumifikaciju plodova, pobačaj, prašenje slabe (avitalne) i/ili mrtve prasadi, prasadi sa malformacijama i kongenitalnim tremorom (14) kao i uginuće u kratkom periodu nakon prašenja ili kasnije, tokom života (84). Karakteristične makroskopske promene kod mrtvorodne i kongenitalno inficirane prasadi su alopecija, anasarka, ascites, hidrotoraks i nekroza perifernih delova tela (45). Transplacentarna infekcija fetusa tokom faze organogeneze može indukovati brojne malformacije: hipoplazija pluća, malformacije pulmonarne arterije, fisure kore bubrega, multipla septa žučne kese, defekti prednjih nogu (artrogriposis) (84) kao i deformitete glave (mikrognacija i mikroencefalija). Kod perzistentno inficirane prasadi, krvarenja su slabije izražena ili odsutna (45) u poređenju sa infekcijom posle prašenja. Ovo ukazuje da su uključeni različiti patološki mehanizmi (88).

Virus KKS interferira sa razvojem CNS-a i dovodi do cerebralnih defekata. Zavisno od vremena nastanka transplacentarne infekcije, lezije CNS-a obuhvataju demijelinizaciju, disgenezu, cerebralnu kavitaciju, cerebelarnu hipoplaziju i hipomijelogenezu (37).

## 2. 7. IMUNOPROFILAKSA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

Najstariji vid imunoprofilakse protiv KKS je tzv. metoda sero-profilakse (inokulacija hiperimunog seruma i virulentnog soja virusa). Tehnika je napuštena jer je primena virulentnog virusa bila uzrok širenja KKS (38). Nakon toga je usledila proizvodnja inaktivisanih vakcina, ekspozicijom antigena virusa KKS hemijskim sredstvima (toluidin plavo, formalin, kristal violet itd.) i nanošenjem istog na adjuvans (4). Inaktivisane vakcine nisu prevenirale infekciju tj. umnožavanje i izlučivanje virusa iz organizma vakcinisane jedinke (89). Zbog toga i drugih razloga (neophodnost revakcinacije, problem uniformne inaktivacije virusa) njihova primena je napuštena (4).

Modifikovane žive vakcine su poreklom od atenuisanih divljih sojeva virusa, dobijenih pasažom i adaptacijom istih na organizam kunića (61). Lapinizirani «Rovac» soj virusa je proizveden nakon 250 pasaža na kunićima i nakon 800 pasaža istog kroz kuniće proizvedena je prva atenuisana vakcina na bazi LPC soja virusa KKS (L-lapinizacija; PC-dr Coronel of Philippines). U Kini je nakon 214 pasaža kroz kuniće virulentnog Shimen soja proizveden lapinizirani soj (28). Konačno, 1957. godine 480. generacija lapiniziranog soja je nazvana Kineski soj (K-soj) ili lapinizirani kineski soj (CLS) (45), koji je preko nekadašnje Indo-Kine i Republike Kine prenet u države istočne i zapadne Evrope (54). Za lapinizirani K-soj koji se primenjuje u Evropi smatra se da je poreklom od originalnog CLS soja i u svetu je poznat pod različitim pseudonimima: „CL“, „LC“, „C“ ili „K“ soj (28). Postoji veliki broj sojeva virusa koji se ubrajaju pod nazivom K-soj bez mogućnosti precizne provere da li imaju ili ne zajedničko poreklo. Poznati su i atenuisani sojevi derivati: CR20, C4 (Leunen soj), PSC2 soj, IFFA sojevi (IFFA/A/22, IFFA/A/49), CL-soj („Chinese strain Lyon“) (4). Međutim, proizvodni sistem na kunićima zahteva postojanje priplodne kolonije i problem je standardizacija sadržaja virusa u vakcini. Zbog navedenog, K-soj je adaptiran za rast na različitim kulturama tkiva: SK6, MPK („minipig kidney“) itd. Litar supernatanta kulture tkiva sadrži oko milion doza vakcine, dok je za približno istu količinu potrebno oko 2000 kunića. Pasažom virulentnog ALD soja u kulturi ćelija bubrega zamorca dobijen je atenuisani GPE-soj (G-guinea; P-pig; E-exaltation negative strain) dok je nakon više od 170 pasaža virulentnog Alfort soja u ćelijskoj liniji PK-15 dobijen Thiverval soj (28). Zadnja dva soja predstavljaju tzv. hladne sojeve (optimalna

temperatura za rast je 30-33 °C) i za razliku od divljeg soja brzo se inaktivišu na temperaturi 56 °C (4). Soj PAV-1 se proizvodi u kulturi tkiva kostne srži svinja dok je PAV-250 dobijen nakon 250 pasaža u ćelijskoj liniji PK-15 (59). Zakonom se propisuje obaveza primene jednog od navedenih sojeva u određenoj državi ali najveći broj podataka se odnosi na K-soj (54).

### **Subjedinične (marker) vakcine protiv KKS**

Glavni problem primene atenuisanih vakcina je nemogućnost razlikovanja specifičnih antitela nakon vakcinacije od istih nakon infekcije tj. nemogućnost primene seroloških testova za ustanovljavanje inficiranih svinja u vakcinisanoj populaciji (57). Da bi se ovaj problem rešio, istraživanja su usmerena ka razvoju marker vakcina (92). Postoje dve marker strategije: «negativni marker» tj. odsustvo bar jednog antigenog epitopa, domena ili proteina u vakcini u poređenju sa divljim sojem virusa i „pozitivni marker“ tj. uključivanje imunodominantnog epitopa ili proteina u vakcinu, koji indukuje imunološki odgovor različit u odnosu na divlji soj virusa. Svi kandidati za marker vakcine se baziraju na negativnoj marker strategiji. Termin marker vakcine u osnovi nije tačan, jer vakcina ne sadrži marker molekul i vakcinalni soj se ne razlikuje od divljeg soja virusa, već se serološki odgovor inficiranih životinja razlikuje od odgovora vakcinisanih (28). Marker vakcine se nazivaju i DIVA vakcine („Differentiating Infected from Vaccinated Animals“) i većina sadrži glikoprotein E2 omotača virusa koji je glavni imunogeni protein za sintezu specifičnih antitela (92). U DIVA strategiji, utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv proteina koji nije uključen u vakcinu (glikoprotein E<sup>ms</sup>) se vrši diferencijalnim ELISA testom (D-ELISA). Prva DIVA vakcina je obuhvatala gE-negativni virus MA kao vektor koji eksprimira glikoprotein E2 virusa KKS (89). Nakon toga usledila je generacija subjediničnih vakcina gde je gen koji kodira protein E2 ubačen u vektor (bakulovirus) uzgajan u kulturi ćelija insekata (57). Zbog delecije C-terminalnog transmembranoznog regiona na genu E2, on se eksprimira u rekombinantnom bakulovirusu uzgajanom u insektnim ćelijama, koje vrše glikozilaciju i izlučuju E2 u medijum. Nakon produkcije E2 ćelije se uklanjaju ultrafiltracijom, bakulovirus se inaktiviše 2-bromoetil-iminobromidom i vakcina se formuliše emulgovanjem E2 u medijumu voda-ulje-voda adjuvans (3). Subjedinična vakcina je marker vakcina samo sa pratećim D-ELISA testom kojim se ustanovljavaju

antitela protiv E<sup>rns</sup> u vakcinisanoj populaciji. U EU su licencirane dve subjedinične E2 vakcine i prateći D-ELISA test (5). Jedna vakcina sadrži protein E2 soja Brescia virusa KKS dok druga sadrži protein E2 soja Alfort/Tübingen (28). Proizvedene su i subjedinične vakcine kojima nedostaje A ili B/C antigeni domen glikoproteina E2 (89).

### **Nove generacije vakcina protiv KKS (vakcine kandidati)**

Od novih generacija vakcina zahteva se da imaju efikasnost atenuisane vakcine sa principima DIVA dijagnostike (3). **Rekombinantne himerične vakcine** predstavljaju prvu strategiju u razvoju vakcina kandidata (89). U okviru rekombinantnih vakcina atenuisani virusi neškodljivi za organizam domaćina su dostavni vektori antigena KKS (protein E<sup>rns</sup>, E2 ili oba). Vektor sistemi obuhvataju MA virus (rPRV-E2), svinjski adenovirus (rPAV-E2), svinjski parapoksvirus (rPPV-E2) i kompatibilni su sa DIVA strategijom baziranoj na E<sup>rns</sup> D-ELISA testu (3). Međutim, problem primene je patogeni potencijal virusa vektora. Dva su pristupa u konstrukciji nepatogenog vakcinalnog virusa iz članova familije Pestivirusa. U prvom, konstruisana su dva himerična soja: CP7\_E2alf (u BVDV soj CP7 protein E2 je zamenjen sa istim iz virusa KKS soj Alfort 187) i CP7\_E2gif (BVDV/BDV himerični soj) (28). U drugom pristupu, zamenom gena za E2 ili E<sup>rns</sup> K-soja sa homolognim sekvencama BVDV II soj 5250 dobijeni su himerični pestivirusi (Flc9 i Flc11) (89). Specifična antitela indukovana sa KKS/BVDV himerama (himeranti-anti-KKS antitela) razlikuju se od antitela indukovanih roditeljskim virusom. Zavisno od zamenjenog regiona, primenjuje se i odgovarajući D-ELISA test (32). Himerični pestivirusi imaju potencijal ali himerična priroda komplikuje njihovo prihvatanje (48).

Parcijalnom ili kompletnom delecijom gena E<sup>rns</sup> ili E2, dobijen je atenuisani mutantni soj virusa KKS sa negativnim markerom i imunogenim karakteristikama roditeljskog K-soja (**trans - komplementarni delecioni mutanti**). Oni se autonomno replikuju nakon RNK transfekcije bez nastanka potomstva (replikoni) (3). Moguća je i substitucija E<sup>rns</sup> ili E2 gena u kreiranju soja virusa sa negativnim markerom (**E<sup>rns</sup> - ili E2 substitucionni mutanti**). **Peptidne vakcine** obuhvataju antigene domene A ili BC proteina E2 i indukuju sintezu peptid-specifičnih antitela nakon imunizacije. Njihova prednost je što nema molekula patogena u organizmu a nedostatak slaba imunološka zaštita. Kandidati su i **DNK vakcine, epitop-vakcine i virusne replikon partikule**

(VRP), označene i kao pseudo-infektivne virusne partikule koje sadrže RNK sa parcijalnom ili kompletnom delecijom na najmanje jednom genu koji kodira strukturne proteine (28). Problem primene navedenih vakcina je kritički stav javnog mnjenja u pogledu genetski modifikovanih mikroorganizama (32).

### **Efikasnost vakcina sa K-sojem virusa klasične kuge svinja**

U proceni efikasnosti vakcina značajno je kada nastupa, koliko traje imunološka zaštita i prevencija horizontalnog i vertikalnog prenošenja virusa KKS (44). Zaštita od infekcije treba da se postigne u najkraćem vremenskom periodu nakon vakcinacije (21). Vakcinacija treba da štiti ne samo od kliničkog oboljenja već i od infekcije, viremije i izlučivanja virusa nakon veštačke ili prirodne infekcije virulentnim virusom (44). Atenuisane vakcine sa K-sojem se razmatraju kao „zlatni standard“ imunološke zaštite (3) ali na efikasnost vakcinacije utiču kolostralna antitela, infekcija drugim patogenima (26), kao i soj i titar virusa u vakcini. Aplikacijom različitih doza K-soja i veštačkom infekcijom 14 dpv, utvrđeno je da vakcinacija sa 80 PD<sub>50</sub> (protektivna doza) obezbeđuje zaštitu (4) ali se zahteva da vakcina sadrži najmanje 100 PD<sub>50</sub> (EU Pharmakopea, 2008). Imunitet nakon aplikacije K-soja traje godinu dana i duže (smatra se doživotno) (5). Svinje vakcinisane K-sojem su zaštićene od jednokratne i višekratne veštačke infekcije virusom KKS. Kina soj pripada subgenotipu 1.1 i indukuje zaštitu protiv sojeva virusa svih genogrupa (heterotipična zaštita) (78).

Ispitivano je horizontalno prenošenje virusa KKS kod svinja vakcinisanih K-sojem i veštački inficiranih 0, 7 i 14 dpv. Uprkos viremiji i kliničkog oboljenja prasadi koja su inficirana 0 dpv, nije utvrđeno horizontalno prenošenje virusa na prasad u kohabitaciji, vakcinisanu istog dana. Ovo se objašnjava činjenicom da je potrebno 4 dana da inficirane svinje postanu infektivne, u kom periodu vakcinisane svinje u kontaktu stiču imunitet koji prevenira infekciju. Veštačkom infekcijom 7 ili 14 dpv, kod direktno inficiranih svinja nije utvrđeno kliničko oboljenje i viremija niti infekcija prijemčivih jedinki u kontaktu (26). Ukoliko se svinje vakcinišu K-sojem 1, 2 ili 4 dpi virulentnim sojem virusa, uginu od KKS, što ukazuje da vakcinacija nema uticaja na ishod infekcije. Vakcinacija K-sojem ne samo da indukuje kliničku, već i kompletnu zaštitu sa infektivnog aspekta (sterilni imunitet) i nije utvrđena replikacija, viremija i izlučivanje virusa i kliconoštvo nakon veštačke infekcije visoko virulentnim sojem (24).



Nije utvrđena vertikalna infekcija, jer vakcinacija prevenira replikaciju virusa praktično kompletno. Međutim, smatra se da podaci o ovom kriterijumu efikasnosti nisu kompletni. Ukoliko se svinjama aplikuje suboptimalna doza vakcine, antigen virusa se nakon veštačke infekcije može utvrditi u tonzilama. Kada je titar virusa u vakcini na propisanim vrednostima, fenomen kliconoša se ne javlja i nastanak kliconoštva infekcijom vakcinisanih svinja ne treba razmatrati kada se vakcinacija obavi pravilno (89). Efikasnost vakcina se razlikuje u terenskim uslovima u poređenju sa laboratorijskim (5). Najveći broj eksperimentalno vakcinisanih krmača je seropozitivno nakon 2.5 - 3 godine, dok je manje od polovine krmača vakcinisanih u terenskim uslovima seropozitivno godinu dana kasnije (88). Ispitivanjem efikasnosti atenuisanih vakcina u Meksiku utvrđeno je da je zaštita K-sojem na nivou zapata niža od očekivane (64% svinja sa 100% zaštitom). Nakon čuvanja na 37 °C tokom 14 dana 66% vakcina je prošlo test efikasnosti. Ispitivanjem stabilnosti rastvorene vakcine utvrđeno je da je rekonstituisana vakcina efikasna nakon čuvanja 1 čas na 37 °C (63).

### **Efikasnost subjedinične vakcine protiv klasične kuge svinja**

U EU je realizovan projekat ispitivanja efikasnosti subjediničnih vakcina na zalučenim prasadima (86) i krmačama (19). Eksperimentalno je ispitivana efikasnost subjediničnih vakcina u prevenciji horizontalne infekcije odnosno uticaj na klinički tok, umnožavanje i izlučivanje virusa infekcijom u različitim intervalima nakon vakcinacije. Prasad su vakcinisana subjediničnom vakcinom 21, 14, 10 i 7 dana pre veštačke infekcije. Pri tome, polovina prasadi u grupi je inficirana, dok su preostale jedinke bila vakcinisana prasad u direktnom kontaktu. Veštačkom infekcijom 7 dpv i 10 dpv nije utvrđena klinička zaštita i utvrđeno je prenošenje KKS na vakcinisane jedinke u kontaktu. Prasad inficirana 14 i 21 dpv nisu klinički obolela ali je utvrđena replikacija virusa u organizmu direktno inficiranih i horizontalno prenošenje virusa na vakcinisane jedinke. U grupi inficiranoj 21 dpv, kod 80% prasadi E<sup>ms</sup> antitela su utvrđena 10-21 dpi dok su kod vakcinisanih svinja u direktnom kontaktu ista utvrđena 14 - 35 dpi. Kod vakcinisanih i direktno inficiranih jedinki umanjena je replikacija i kontaktno prenošenje virusa. Međutim, takav zaštitni efekat uzrokuje uvećanje broja supklinički i hronično inficiranih (kliconoša). Najkraći period kada se može očekivati da vakcinacija umanjí izlučivanje virusa iz organizma direktno inficiranih jedinki je 14 dpv. Ukoliko se

svinje inficiraju pre 14 dpv, imunosupresivno dejstvo virusa interferira sa sintezom antitela (86).

Infekcijom 7, 10 i 14 dpv utvrđena je replikacija inokulisanog virusa i kontaktna infekcija. Infekcijom 21 dpv, 3 i 6 meseci nakon vakcinacije nije utvrđena kontaktna infekcija neimunih jedinki. Interval 14 dpv je značajan u vanrednim situacijama kada se vrši vakcinacija u neposrednom okruženju žarišta kao i kada postoji rizik vakcinacije inaparentno inficiranih zapata (24). Zigler and Kaden (2002) su eksperimentalno utvrdili da dvokratna vakcinacija u intervalu od 4 nedelje štiti od kliničkog oboljenja, nije utvrđena viremija i ekskrecija virusa veštačkom infekcijom 14 dana posle revakcinacije (dpv<sub>2</sub>). Dvokratna vakcinacija u razmaku od 14 dana i veštačka infekcija 14 dpv<sub>2</sub> rezultira viremijom bez ekskrecije virusa. Dvokratnom vakcinacijom u intervalu od 14 odnosno 28 dana, i veštačkom infekcijom u vreme revakcinacije odnosno 7dpv<sub>2</sub>, umanjeno je izlučivanje i replikacija virusa, ali je utvrđena kontaktna infekcija neimunih jedinki.

Ispitivanjem efikasnosti subjedinične vakcine postignuti su različiti rezultati. Nema jasnog objašnjenja za utvrđene različitosti. Mogući razlozi su primena različite vakcine i kvalitet ispitane serije, primena homolognog ili heterolognog soja virusa u odnosu na soj u vakcini i način veštačke infekcije, različitost metodologije (89). Zaštita je utvrđena 21 dpv, ali je i u ovom intervalu utvrđen genom virusa u krvi RT-PCR tehnikom (24). Kada su svinje vakcinisane subjediničnom vakcinom veštački inficirane (kohabitacija sa veštački inficiranim neimunim jedinkama), utvrđeni su pozitivni nalazi na virus KKS tehnikom RT-nPCR (26). U vanrednim uslovima, imunološka zaštita treba da se postigne u što kraćem periodu i subjedinična vakcina sa tog aspekta ne zadovoljava (92). Jednokratna vakcinacija indukuje zaštitu, ali je potrebno 1-2 nedelje duže za imunitet koji nije solidan kao primenom K-soja. Klinička zaštita prasadi je utvrđena tek 14 dpv<sub>2</sub> ili 6 nedelja nakon jednokratne vakcinacije subjediničnom vakcinom (89). Imunitet nakon jednokratne vakcinacije subjediničnom vakcinom traje 6 - 13 meseci (14) i obezbeđuje zaštitu od kliničkog oboljenja ali ne i od infekcije i izlučivanja virusa iz organizma vakcinisane inficirane jedinke (38). Da bi se ispitala infektivnost *in vivo*, mesom i organima svinja vakcinisanih i inficiranih, obolelih i žrtvovanih u različitim intervalima nakon veštačke infekcije (21-70 dpi) hranjene su neimune jedinke i ustanovljena je infekcija. Vertikalno prenošenje virusa KKS je

utvrđeno u različitom stepenu kod jednokratno i dvokratno vakcinisanih veštački inficiranih krmača (27). Dvokratna vakcinacija subjediničnom vakcinom štiti nazimice od kliničkog oboljenja ali ne i od infekcije. Klinička zaštita nije primarni cilj, čak je i kontrindikovana (24) jer vakcinacija maskira infekciju suprasnih krmača, sa razvojem sindroma krmača kliconoša i kasne pojave bolesti prasadi (32).

Subjediničnoj vakcini nedostaju osobine brze i kompletne zaštite nakon jednokratne aplikacije (28). Dalja istraživanja treba da odgovore da li veći kvantitet proteina E2 u dozi, kombinacija različitih proteina, drugi put aplikacije, inkorporacija citokina ili promena formulacije adjuvansa (npr. dodavanje inulina) mogu potencijalno poboljšati efikasnost subjediničnih vakcina (3).

### **Sigurnost vakcina sa K-sojem virusa KKS**

Za vakcinalni soj virusa KKS se smatra da poseduje izražena imunogena svojstva i da je kao antigen u vakcini neškodljiv za imunizovane životinje (89). Kina soj ima U-inserciju od 13 kontinuiranih nukleotida na 3' NCR u poređenju sa virulentnim sojem virusa. Nije u potpunosti razjašnjeno da li ova insercija kao rezultat daje avirulentnost K-soja (89) ali svakako umanjuje efikasnost RNK sinteze i stabilnost sekundarne strukture 3'-NCR (7). Vakcina je sigurna za primenu kod eksperimentalno imunološki kompromitovanih svinja što ukazuje da se toleriše u uslovima stresa (88). Utvrđene su aberacije hromozoma, što ukazuje da atenuisani soj nije izgubio mutageni kapacitet, a genotoksičnost se dovodi u vezu sa citotoksičnim efektom glikoproteina E<sup>ms</sup> (28). Lapinizirani K-soj sadrži 3.8-5.9 mg proteina kunića u dozi i nakon vakcinacije krmača sintetišu se antitela protiv istog. Kolostralna antitela prasadi reaguju na isti alergen u vakcini i moguća je pojava anafilaktičkog šoka kod po prvi put vakcinisane prasadi (4). Problem je prevaziđen adaptacijom K-soja na kulturu tkiva (90). U Meksiku je saopštena neželjena reakcija kod prvi put vakcinisanih svinja lapiniziranim K-sojem koja po opisu odgovara anafilaktičkom šoku. Utvrđeno je da reakcija koja u suštini predstavlja endotoksični šok, posledica bakterijske kontaminacije i prisustva endotoksina u vakcini. Na enzootski inficiranim farmama svinja, zabeležena je pojava oboljenja i uginuća oko 14 dpv (pojava „postvakcinalne KKS“). Za nalaz je okrivljeno nedovoljno atenuisanje K-soja. Međutim, u perzistentno inficiranim zapatima, vakcinacijom viremičnih jedinki, virus se jatrogeno prenosi na prijemčive svinje (63).

Kina soj se replikuje u organizmu i moguća je pojava blage febre i kratkotrajne viremije. Kod novorođene prasadi nisu utvrđene neželjene reakcije (91) i prasad poreklom od neimunih krmača se mogu vakcinisati u uzrastu 1 dan (89). Aplikacijom K-soja tokom suprasnosti nisu utvrđene neželjene reakcije (65).

Eksperimentalno je ispitano da li K soj može da povрати virulenciju i rezultati su pokazali odsustvo takve mogućnosti. Virus zadržava atenuisane osobine nakon 30 pasaža u organizmu prijemčivih svinja, broj koji je malo verovatan na terenu (88). Zabeleženo je širenje vakcinalnog soja virusa kod nevakcinisanih krmača koju su sisala vakcinisana prasad, nevakcinisanih i vakcinisanih krmača i eksperimentalno kod nevakcinisanih jedinki u direktnom kontaktu sa vakcinisanim. Međutim, ni u jednom slučaju nije opisana perzistencija u zapatu. Lapinizirani K-soj virusa se replikuje u limfoidnim tkivima i tonzilama. Viremija je utvrđena 5 - 14 dpv ali se ne detektuje uvek. Metodom RT-PCR genom K-soja je utvrđen u tonzilama do 42 dpv i u limfnim čvorovima do 17 dpv. Perzistiranje genoma K-soja virusa u tonzilama objašnjava horizontalno prenošenje i omogućava za soj specifična PCR ispitivanja, nukleotidno sekvencioniranje i diferencijaciju vakcinisanih od inficiranih jedinki (47).

### **Sigurnost subjediničnih vakcina**

Nakon vakcinacije subjediničnom vakcinom na mestu aplikacije moguća je pojava blage lokalne inflamatorne reakcije (eritem, otok) u trajanju 3-4 dana (19) bez sistemskih neželjenih efekata (89). Nakon ponovljene vakcinacije nisu utvrđeni neželjeni efekti na proizvodne parametre (58). Subjedinična vakcina bazirana na glikoproteinu E2 kao antigenu razmatra se kao inaktivisana vakcina. Kod prasadi poreklom od krmača vakcinisanih subjediničnom vakcinom nakon vakcinacije i revakcinacije istom, nisu zabeleženi neželjeni efekti (55). Subjedinična vakcina je bezbedna i ne utiče na fertilitet i reproduktivne performanse suprasnih krmača (63). U terenskim uslovima, nisu zabeležene postvakcinalne reakcije primenom subjedinične vakcine (13).

### **Imunološki odgovor nakon vakcinacije K-sojem**

Kina soj je visoko efikasan u stimulaciji dugoročnog imuniteta indukcijom humoralnog i ćelijskog imunog odgovora (44). Imunološki odgovor nakon aplikacije K-

soja, meren otpornošću na veštačku infekciju je brz, intenzivan i doživotan (89). Međutim, specifična antitela se ustanovljavaju najranije 9 dpv (VNT) i 11 dpv (ELISA test) (47) odnosno u najvećem broju slučajeva posle 21 dpv (78). Vakcinacija K-sojem indukuje sintezu antitela koja kontinuirano rastu 4 - 5 meseci i perzistiraju godinama nakon jednokratne vakcinacije ali i nestaju kod pojedinih jedinki. Veštačkom infekcijom 6 meseci posle vakcinacije, titar antitela raste, što ukazuje na replikaciju virusa. Smatra se da titar antitela do 1:12.5 (VNT) ne pruža zaštitu od veštačke infekcije virulentnim sojem i dovodi do uginuća (27%) i izlučivanja virusa (64%). Titar 1:30 obezbeđuje zaštitu ali ne sprečava izlučivanja virusa, dok titar  $\geq 32$  obezbeđuje zaštitu i sprečava izlučivanje virusa (81). Ukoliko se vrši vakcinacija mladih jedinki, neophodna je revakcinacija u cilju potpune zaštite (78). Najveći broj krmača na terenu je seropozitivan 2.5 - 3 godine nakon vakcinacije, a otporne su na veštačku infekciju nakon 6 - 7 godina (24). Vakcinisane svinje su zaštićene od veštačke infekcije iako imaju nizak titar ili se isti ne ustanovljava (19) i prisustvo specifičnih antitela nije preduslov otpornosti na veštačku infekciju (91). Humoralna antitela igraju glavnu ulogu u imunitetu protiv KKS iako se ne može uvek potvrditi veza između antitela i zaštite. Postoji siva zona titra antitela u okviru koje je ishod veštačke infekcije nepredvidiv. Svinje koje ne odgovore na vakcinaciju mogu biti otporne na infekciju virulentnim sojem virusa zbog brzog sekundarnog imunološkog odgovora. Međutim, kada ista nisu detektabilna, otpornost ukazuje na značaj ćelijskog imuniteta (81). Najranije 6 dpv K sojem, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi se može utvrditi prisustvo interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) pozitivnih ćelija specifičnih za virus KKS, što je indikator ćelijskog imuniteta. U to vreme specifična antitela nisu detektabilna, ali su svinje zaštićene od veštačke infekcije virulentnim sojem virusa što ukazuje na značajnu ulogu ćelijskih imunoloških mehanizama, koji su uključeni u odbrani 7 dpi. Utvrđivanje specifičnih IFN- $\gamma$  pozitivnih ćelija može se primeniti u kontroli imunološkog odgovora u kratkom periodu nakon vakcinacije. Svinje vakcinisane K-sojem imaju značajno više vrednosti pozitivnih IFN- $\gamma$  ćelija u poređenju sa nevakcinisanim, koje se mogu utvrditi u perifernoj krvi do 140 dpv K-sojem. Kod svinja kod kojih je utvrđen veliki broj pozitivnih IFN- $\gamma$  ćelija u vreme veštačke infekcije, utvrđena je zaštita, iako specifična antitela nisu detektabilna (77). Broj IFN- $\gamma$  produkujućih ćelija nakon vakcinacije K-

sojem je niži u poređenju sa vrednostima nakon veštačke infekcije što znači da K-soj indukuje niži nivo ćelijskog odgovora nego infekcija (78).

### **Imunološki odgovor nakon vakcinacije subjediničnom vakcinom**

Subjedinična vakcina indukuje sintezu antitela ali je potreban duži period za postizanje imunološke zaštite (13) u poređenju sa K-sojem što nije iznanađenje jer se sastoji samo od glikoproteina E2. Vakcinacija subjediničnom vakcinom indukuje sintezu antitela protiv E2 najranije 10 dpv (83), većinom 28 dpv (21) i kod svih 14 dpv<sub>2</sub> (55). Revakcinacijom se postiže skok titra antitela koja perzistiraju mesecima ali kod pojedinih jedinki nisu detektabilna 13 meseci kasnije (15). Vakcinisane svinje bez detektabilnih antitela mogu da prežive ili uginu nakon veštačke infekcije (89). Priroda antigena prezentovana imunom sistemu utiče na sposobnost vakcina da indukuju zaštitni imunitet protiv virusa KKS. Protein E2 ne aktivira efikasno aktivnost citotoksičnih T limfocita (CTL) što je jedno od objašnjenja slabije zaštite (78). Najveći broj vakcinisanih i veštački inficiranih svinja preživi infekciju i stiče doživotan imunitet protiv KKS, ali se identifikuju kao „inficirane“ E<sup>ms</sup> D-ELISA testom (28). Nakon vakcinacije poželjna je doživotna zaštita ali se to ne može postići jednokratnom aplikacijom inaktivisanog antigena (15).

### **Vakcinacija prasadi poreklom od imunih krmača**

Prasad poreklom od neimunih krmača su imunokompetentna i mogu se uspešno vakcinisati već 1. dana života (88). Međutim, sa ranom vakcinacijom prasadi javljaju se dva problema. Prvo, ukoliko je krmača vakcinisana, kolostralna antitela interferiraju sa aktivnim imunološkim odgovorom. Drugo, uvećanjem uzrasta prasadi opada titar antitela, što ima za posledicu populaciju nedovoljno zaštićenih tovljenika. Interferencija kolostralnih antitela je značajan faktor koji utiče na imunološki odgovor nakon vakcinacije prasadi protiv KKS: što je viši titar kolostralnih antitela u vreme vakcinacije inhibicija je snažnija (46).

Smatra se da su prasad vakcinisanih krmača zaštićena od letalnog ishoda infekcije prvih nedelja života i mogu preživeti infekciju čak i visoko virulentnim sojem virusa (88). Vakcinacijom prasadi K-sojem uzrasta 5 nedelja utvrđen je veći titar antitela (77) nego vakcinacijom u 3-4 nedelji života kada se ustanovljava iregularni

imunološki odgovor (88). Pasivni imunitet štiti od uginuća prasadi prvih 5 nedelja života ali ne i od umnožavanja i izlučivanja virusa KKS (61). Noviji rezultati ispitivanja dužine trajanja zaštitnog nivoa maternalnih antitela ukazuju da su prasad poreklom od krmača vakcinisanih K-sojem virusa samo delimično zaštićena od infekcije virusom KKS, uprkos činjenici da kolostralna antitela još uvek perzistiraju (70). Maternalna antitela perzistiraju 7 nedelja i opadaju do uzrasta 10 nedelja (53) ali je saopštena perzistencija i do 90 dana života (44).

Uzrast kada se može vakcinisati prasad zavisi od vremena katabolizma kolostralnih antitela iz organizma. Smatra se da najmanje 80% prasadi može da se vakciniše atenuisanom vakcinom u uzrastu 6 nedelja odnosno 90% u uzrastu 7 nedelja i 100% u uzrastu 8 nedelja (88). Eksperimentalno je ispitivano da li se kod prasadi vakcinisane u uzrastu 2 i 6 nedelja sa i bez kolostralnih antitela umnožava virus KKS nakon veštačke infekcije 7 dpv. Kod prasadi sa visokim titrom kolostralnih antitela antigen virusa je utvrđen u epitelu kripti i limfocitima tonzila dok je kod prasadi sa niskim titrom isti ustanovljen u superficijalnom epitelu, u epitelu kripti i limfocitima. Smatra se da je umnožavanje i lokalizacija virusa indikator stepena imuniteta. Prasad sa kolostralnim antitelima prežive infekciju virusom KKS ali mogu izlučivati virus određen vremenski period. Vakcinacija je delimično ili potpuno efikasna u prisustvu pasivnog imuniteta odnosno prevenira ili umanjuje replikaciju i izlučivanje virusa (4). Zbog interferencije kolostralnih antitela, preporuka je da se prasad poreklom od imunih krmača vakcinišu u uzrastu 7-9 nedelja, što se može realizovati u zapatu slobodnom od KKS, ali se ne može primeniti bez rizika u uslovima enzooske infekcije. Odlaganje vakcinacije do uzrasta 7-9 nedelja ostavlja 100% prasadi prijemčivim za virus.

U cilju prevazilaženja problema interferencije kolostralnih antitela, ispitivana je vakcinacija prasadi pre ili u kratkom vremenu nakon sisanja kolostruma. Efikasnost vakcinacije zavisi od brzine resorpcije kolostralnih antitela u prvim satima života prasadi. Vakcinacija prasadi poreklom od vakcinisanih krmača 1, 2 i 3 sata pre sisanja kolostruma obezbeđuje efikasnu zaštitu u 10 nedelji života (91). Lai et al. (1986) su vršili vakcinaciju prasadi poreklom od vakcinisanih krmača K-sojem na prašenju i 1, 2, 3 sata nakon sisanja kolostruma. Prekolostralnom vakcinacijom prasadi uspostavlja se solidan imunitet i prevazilazi problem interferencije. Vakcinacija prasadi 3 sata nakon sisanja kolostruma štiti od veštačke infekcije virulentnim virusom u 8 nedelji života.

Međutim, saopštena je parcijalna inhibicija humoralnog odgovora prasadi nakon rane postnatalne imunizacije (51).

Vakcinacija indukuje antigenu stimulaciju, imunološki odgovor i otpornost na veštačku infekciju prasadi koja su unela male količine kolostruma. Ukoliko su prasadi posisala kolostrum, kolostralna antitela imaju delimični ili kompletni supresivni efekat na primarni imunološki odgovor koga karakterišu kasna sinteza i niski titar antitela. Efikasnost vakcinacije je obrnuto proporcionalna nivou kolostralnih antitela: 95% prasadi se uspešno imunizuje sa titrom  $< 1:32$  (VNT), dok titar viši od  $1:64$  ima inhibirni efekat. Prekolostralna vakcinacija, 0. dana obezbeđuje zaštitu od veštačke infekcije virulentim sojem virusa i vrši se na pojedinim farmama u Kini. Preporučuje se trokratna vakcinacija 0. – 35. – 75. dana. Porast antitela je obrnuto srazmeran titru pasivnih antitela u vreme vakcinacije. Ukoliko se vakcinacija prasadi sa kolostralnim antitelima obavi u uzrastu 2 meseca, zaštita je 100% na kraju ekonomskog perioda života (69).

Imunološki status praseta nakon uzimanja kolostruma je u direktnoj funkciji imuniteta krmače: ukoliko je vakcinisana duži vremenski period pre prašenja (više od 5 meseci) kolostralna antitela imaju poluživot koji odgovara IgG (10 - 14 dana). Kolostralna antitela prasadi poreklom od krmača vakcinisanih u kratkom periodu pre prašenja (55 dana) imaju kratak poluživot (IgM 5 - 6 dana) ali snažan immunosupresivni efekat na primarni imunološki odgovor nakon vakcinacije (46). Minimalni nivo antitela dovoljan za zaštitu naziva se “prag pasivne zaštite”. Ukoliko se vakcinacija obavi u uzrastu 9-13 dana, kod prasadi sa visokim titrom kolostralnih antitela, izostaje primarni imunološki odgovor. Primarna sinteza antitela u prisustvu kolostralnih antitela izostaje ili je slaba i zakasnela u poređenju sa prasadima bez pasivno primljenih antitela. Vakcinacija je efikasna kada neutralizaciona aktivnost u serumu padne ispod određenog nivoa. Ova vrednost je “prag efikasne vakcinacije“ i zabeležena je u uzrastu 30-35 dana. Vakcinacijom u ovom uzrastu, prasadi poreklom od imunih krmača su zaštićena od virulentne veštačke infekcije do kraja ekonomskog perioda iskorištavanja (53).

Vakcinacija prevenira širenje KKS i obezbeđuje populaciji imunološki zaštitni „kišobran“ koji kontroliše potencijalni prodor slabo virulentnih sojeva virusa. Imajući u vidu period iskorištavanja krmača i pasivne zaštite koju obezbeđuje potomstvu, one su kategorija koja treba da se vakciniše (89). Nazimice su primarna ciljna grupa za



revakcinaciju jer štite potomstvo u prvim nedeljama života. One treba da budu zaštićene pre dostizanja reproduktivne starosti i imaju vitalnu ulogu u održavanju imuniteta zapata (81).

U enzooski inficiranim zaptima razlog neuspešne imunizacije je perzistencija kolostralnih antitela koja interferiraju sa vakcinacijom (91). Bez ekspozicije infekciji, nivo kolostralnih antitela prasadi postepeno opada. Međutim, u enzooski inficiranim zaptima, virus cirkuliše na farmi. Ukoliko se vakcinisana krmača eksponira virusu, izostaje kliničko oboljenje ali raste titar antitela kao odgovor na infekciju a samim tim i nivo antitela u kolostrumu. Visoke vrednosti kolostralnih antitela štite prasad ali je za opadanje na vrednosti koja ne interferiraju sa vakcinacijom potreban duži vremenski period tj. duži je period skrivene prijemčivosti. Ukoliko se K-soj aplikuje prasadima sa visokim vrednostima kolostralnih antitela, prasad prežive veštačku infekciju ali se virus izoluje kod 50% jedinki. Optimalna zaštita se postiže vakcinacijom prasadi sa titrom kolostralnih antitela  $\leq 1:32$  (77).

Kontrolom kolostralnih antitela prasadi uzrasta 5 nedelja sa farme gde se obavlja vakcinacija K-sojem virusa, utvrđen je neujednačen nalaz. Kod većine prasadi titar kolostralnih antitela je 1:8 – 1:64; kod manjeg broja je 1:64. Eksperimentalnom infekcijom visoko virulentnim sojem virusa 13 dpv, u grupi sa visokim titrom (1:64) kod 50% prasadi su utvrđeni klinički znaci KKS i virus je izolovan iz krvi i organa. Prasad sa nižim titrom antitela ( $< 1:64$ ) nisu obolela i nije izolovan virus. Vakcinacija K-sojem pri srednjim vrednostima kolostralnih antitela, ne indukuje detektabilni imuni odgovor ali vrši pripremu imunog sistema i nakon infekcije ustanovljava se sekundarni imunološki odgovor. Efekat nije utvrđen kod prasadi sa visokim titrom kolostralnih antitela jer je aktivni imunitet inhibiran pasivnim. Kina soj efikasno indukuje imunitet protiv KKS kod prasadi sa titrom maternalnih antitela  $< 1:64$  u vreme vakcinacije dok veći titar suprimira imunološki odgovor i zaštita izostaje (77).

Na Tajlandu su vršena ispitivanja primenom subjedinične vakcine kod prasadi poreklom od krmača vakcinisanih atenuisanom vakcinom i utvrđena je interferencija pasivnog imuniteta (K soj) na aktivni imunitet indukovani subjediničnom vakcinom. Za zaštitu prasadi sa niskim vrednostima kolostralnih antitela neophodna je dvokratna vakcinacija subjediničnom vakcinom ali je i pored toga utvrđena febra i viremija nakon infekcije (12). Na suprot tome, Lipowski et al. (2000) su prasad poreklom od krmača

vakcinisanih subjediničnom vakcinom, vakcinisali (5, 7 i 9 nedelja) i revakcinisali subjediničnom vakcinom (9, 11 i 13 nedelja). Najviši nivo kolostralnih antitela je utvrđen u 3 nedelji. Bolji rezultati su ustanovljeni kod prasadi prvi put vakcinisane u uzrastu 5 ili 7 nedelja nego u 9. nedelji života. Kod nevakcinisane prasadi kolostralna antitela su utvrđena do 7. (11.1%) i 13. nedelje (5.6%) života. Vakcinacijom prasadi poreklom od krmača vakcinisanih subjediničnom vakcinom, nije utvrđen efekat interferencije kolostralnih antitela, što se objašnjava činjenicom da je subjedinična vakcina inaktivisana i aktivni imunitet ne interferira sa pasivnim.

Lai et al. (1980) su izvršili vakcinaciju prasadi uzrasta 5 - 33 dana sa različitim koncentracijama kolostralnih antitela (0 do 1:64) LPC vakcinom i veštački inficirali nakon 7 nedelja. Prasad sa titrom antitela  $\leq 1:32$  (VNT) su preživela veštačku infekciju dok su sa titrom 1:32 i 1:64 imala patološke promene. Kod prasadi sa titrom antitela  $\geq 1:64$  utvrđena je klinički KKS. Ispitivanjem distribucije maternalnih antitela prasadi uzrasta 1 - 4 nedelje ustanovljeno je da 69% prasadi uzrasta 7 dana, 75% uzrasta 2 nedelje, 95% uzrasta 3 nedelje i 97% uzrasta 4 nedelje ima titar antitela  $\leq 1:32$ . Kod 80% prasadi uzrasta 6 nedelja titar antitela je  $\geq 1:16$  (50).

Ispitivano je da li višekratna aplikacija K-soja suprasnim krmačama ima za rezultat porast titra specifičnih antitela i kolostralnih antitela prasadi. Revakcinacijom krmača tokom suprasnosti vakcinisanih pre pripusta uvećava se titar specifičnih antitela u kolostrumu ali aplikacija više od jedne doze vakcine tokom gestacije nema dodatne pozitivne efekte. Nisu utvrđene značajne razlike titra kolostralnih antitela prasadi poreklom od krmača vakcinisanih jednokratno i dvokratno tokom gestacije (65). U poređenju sa neimunim prasadima, prasad sa kolostralnim antitelima imaju niže vrednosti titra antitela 3 i 6 meseci nakon vakcinacije (83).

U kontrolnoj strategiji, izbegava se rizik vakcinisanih svinja koje ponovo postaju prijemčive, tako što se ne vakcinišu krmače ili se prasad vakciniše u starijem uzrastu. Nevakcinisanje krmača zvuči nelogično, ali ukoliko su sve preostale kategorije vakcinisane, imunitet zapata je siguran. Ukoliko se oprase perzistentno inficirana prasad, infekcija neimunih jedinki i krmača ima funkciju pokazatelja prisustva virusa u populaciji (46). Imunotolerantne jedinice ne odgovaraju serološki na vakcinaciju i nije poznat način reagovanja hronično inficiranih (90).

## Vakcinacija divljih svinja

Oralna imunizacija divljih svinja vakcinom koja sadrži lapinizirani K-soj („C-soj Riems“) virusa KKS je 2001. godine je uključena u zakonsku regulativu EU. U cilju utvrđivanja efikasnosti oralne vakcinacije, ispitivano je horizontalno prenošenje virusa sa vakcinisanih na prijemčive jedinke u kontaktu i vertikalno prenošenje. Utvrđeno je da oralna vakcina indukuje zaštitni imunitet 10 dpv, u trajanju najmanje 10 meseci. Dvokratna vakcinacija (proleće i jesen) u intervalu od 28 dana je preporuka za eradikaciju KKS, dok se tri dvokratne vakcinacije godišnje vrše na početku primene kontrolnih mera. Serokonverzija nakon jednokratne oralne vakcinacije je slična kao nakon parenteralne (77.5% jedinki je seropozitivno 14 dpv i oko 87% 28 dpv). Analizom vrsta koje nisu ciljne (krave, ovce, koze, lisice i miševi), nisu utvrđeni klinički simptomi nakon uzimanja mamka. Vakcinalni virus je genetski stabilan, nije utvrđena reverzija virulencije i mali je rizik od rekombinacije vakcinalnog i divljeg soja virusa (44). Eksperimentalnom infekcijom vakcinisanih suprasnih nazimica visoko ili srednje virulentnim sojem virusa KKS, nije utvrđeno kliničko oboljenje i transplacentarna infekcija fetusa, što ukazuje na sigurnost K-soja u formi oralne vakcine i prevenciju diaplacentarne infekcije (41). Nakon vakcinacije divljih krmača 13, 20 i 26 meseci pre prašenja titar antitela ima konstantne vrednosti. Kratak period pre prašenja zabeležen je blagi pad usled transfera kolostralnih antitela. Kolostralna antitela su utvrđena do 3. meseca života i aktivna imunizacija podmatka nije efikasna pre tog perioda (44). Vakcina se distribuira ručno ili avionima, na dva hranidbena mesta po km<sup>2</sup>, oko 30-40 mamaka po hranidbenom mestu. Vakcina (1.6 ml) je upakovana u blistere, sadrži stabilizatore i prekriva se mamkom na bazi cerealija. Jedna doza sadrži najmanje 10<sup>4.5</sup> tkivne kulture infektivne doze vakcinalnog soja virusa (TCID<sub>50</sub>) (44). Mamci su dobro prihvaćeni od odraslih jedinki kod kojih je utvrđen solidan imunitet (67) ali su u inficiranoj populaciji ciljna grupa mlade jedinke koje zbog slabog pristupa mamcima, nisu dovoljno imunizovane (44). Vakcinalni virus se ne izlučuje sekretima i ekskretima, a kod prijemčivih jedinki u kontaktu nisu utvrđena specifična antitela. Vakcina je bezbedna i nema uticaj na zdravstveni status i rast vakcinisanih životinja (7). Istraživanja su usmerena na oralnu DNK vakcinu (32) i razvoj marker vakcina, koje bi omogućile serološki monitoring širenja infekcija u vakcinisanoj populaciji divljih svinja (89).

## 2.8. KONTROLA I ERADIKACIJA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

### **Rasprostranjenost KKS u svetu**

Oboljenje se sporadično javlja u centralnoj i istočnoj Evropi (16), a enzootski u državama jugoistočnog Balkana (6). U periodu 1996-2004. godine KKS je registrovana u Bosni i Hercegovini (257 žarišta), Bugarskoj (66 žarišta), Rumuniji (203 žarišta) i Republici Srbiji (718 žarišta) (8). I u državama članicama EU, sporadično se registruju žarišta KKS u populaciji domaćih svinja (66). U periodu 1990-1998. godine sporadična žarišta KKS su registrovana u Austriji, Belgiji, Nemačkoj, Italiji, Holandiji, Španiji i Švajcarskoj. Godine 1997-98. epizootija je zahvatila Holandiju i proširila se u Nemačku, Belgiju, Italiju i Španiju (38). Zatim je 2000. godine usledila epizootija u Velikoj Britaniji i 2001. godine u Nemačkoj, Španiji, Slovačkoj i Rumuniji (45). Oboljenje se javlja enzootski u južnoj i centralnoj Americi (35) i karibskoj regiji (48). Na afričkom kontinentu, KKS je dijagnostikovana 2005. godine u Južnoj Africi nakon 87 godina odsustva (67), a prisutna je na Madagaskaru, Mauricijusu, enzootski u jugoistočnoj Aziji i oblasti nekadašnjeg SSSR (30). Sa druge strane, KKS je iskorenjena u skandinavskim državama, Irskoj, Švajcarskoj, Kanadi, SAD, Australiji, Novom Zelandu i Japanu (89). Zbog globalizacije, prometa i uvećanja gustine populacije domaćih i divljih svinja postoji stalna opasnost od širenja KKS u slobodna područja (33).

### **Ekonomski aspekti kontrole KKS**

U XX veku svinjarska industrija je doživela ekspanziju i KKS je postala najznačajnije zarazno oboljenje svinja (45) koje nanosi velike ekonomske gubitke zbog drastičnih kontrolnih mera i zabrane internog i međunarodnog prometa svinja (28). U zadnjih dvadeset godina najveći ekonomski gubici u EU se vezuju sa epizootijom 1997-1998. godine u Holandiji kada je neškodljivo uklonjeno oko 12.4 miliona svinja, sa ukupnim troškovima oko 3 milijarde eura. Pri tome, neškodljivo je uklonjeno oko 0.7 miliona inficiranih svinja, preventivno uklonjeno 1.1 milion svinja i 10.6 miliona iz razloga dobrobiti životinja i sprečavanja širenja KKS (72). U Nemačkoj u periodu 1990-1998. godine registrovano je više od 400 žarišta KKS i neškodljivo je uklonjeno oko 2

miliona svinja sa gubicima oko 1 milijarde eura (36). Iz navedenog proizilazi značaj programa kontrole i eradikacije KKS (67).

### **Programi kontrole i eradikacije KKS**

U kontroli i eradikaciji KKS, primenjuju se dve strategije: vakcinacija atenuisanim vakcinama i politika nevakcinacije, obe sa neškodljivim uklanjanjem inficiranih i na infekciju sumnjivih zapata („stamping out“) (28). U državama članicama EU 1980. godine zakonom definisana kontrola i eradikacija KKS je obuhvatala sistematsku profilaktičku vakcinaciju populacije domaćih svinja i neškodljivo uklanjanje inficiranih zapata (30). Nakon toga je usledila eradikacija sa postepenim prestankom vakcinacije (82) koja je i zvanično zabranjena 1992. godine (72) sa ciljem uspostavljanja slobode prometa ljudi, kapitala, životinja i proizvoda od životinja (2). Politika nevakcinacije se sprovodi i u SAD, Kanadi, južnoj Africi, Japanu, Australiji, Novom Zelandu (28). Mera je usvojena zbog nepostojanja vakcine koja je istovremeno efikasna i omogućava razlikovanje vakcinisanih i inficiranih svinja (24). Prestanak imunoprofilakse je označio postojanje prijemčive populacije svinja za infekciju virusom KKS (98) pa su i kontrolne mere usmerene na prevenciju unošenja virusa (88).

U slučaju izbijanja KKS, na teritoriji EU se sprovode harmonizovane mere: uspostavljanje zaražene (zaštitna) i ugrožene (zona nadzora) zone na udaljenosti 3 odnosno 10 km oko inficiranog zapata, zabrana prometa, neškodljivo uklanjanje inficiranih i zapata sumnjivih na infekciju, preventivno pražnjenje (klanje) potencijalno inficiranih zapata u kontaktu ili u neposrednom okruženju inficiranih zapata (2). Zapati u neposrednoj blizini inficiranih, neškodljivo se uklanjaju bez laboratorijske potvrde KKS. U područjima gusto naseljenim populacijom svinja najveći broj zapata se neškodljivo uklanja iz razloga dobrobiti životinja (28). Naime, kada je na snazi zabrana prometa, farme su prenaseljene za 7 - 14 dana, što ima za posledicu kanibalizam, tuču, prelome ekstremiteta. U cilju prevencije prenaseljenosti, uvodi se zabrana pripusta i prasad neposredno po prašenju i uzrasta 3 - 17 dana se neškodljivo uklanja. Država finansira program otkupa određenih kategorija svinja iz prenaseljenih farmi koje nisu sumnjive na KKS, ali se trupovi uništavaju. Međutim, problem je nedovoljno kapaciteta za neškodljivo uklanjanje svinja (82). Promet i tržište EU 40 dana nakon

uklanjanja zadnjeg inficiranog zapata u potpunosti funkcioniše. Ukoliko se pravovremeno primeni, preventivno pražnjenje zapata svinja ima za rezultat kraće trajanje i manji obim epizootije (66). Repopulacija farmi se obavlja punoprijemčivim jedinkama (34) i vrši se kontrola na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS (80).

Epizootije u skorije vreme u EU su ukazale da je bez primene vanredne vakcinacije kontrola skupa, jer se neškodljivo uklanja veliki broj svinja u cilju sprečavanja širenja KKS (24). Uništavanje miliona neinficiranih svinja javnost osuđuje kao neetičko i usvojena je alternativna kontrolna strategija: vanredna vakcinacija K-sojem prstenasto oko žarišta infekcije. U EU postoji zaliha od milion doza atenuisane vakcine (K-soj) i banka sa subjediničnom vakcinom, što ukazuje na spremnost za alternativnu strategiju (92). Vakcinacija može obuhvatiti farme u radijusu 1, 2 ili 5 km oko inficiranog zapata i otpočinje 7 dana nakon što se ustanovi prvi inficiran zapat (vreme za dozvolu EU komisije) (27). Vakcinišu se zalučena prasada i finišeri ali ne i krmače zbog rizika od nastanka sindroma krmače kliconoše (2). Po okončanju epizootije, vrši se kontrola na prisustvo divljeg soja virusa tehnikom RT-PCR i uvođenje prijemčivih svinja. Ukoliko se ne utvrdi prisustvo divljeg soja virusa KKS u vakcinisanom zapatu, svinje se transportuju na klanje (89).

Ključni elementi kontrole nakon izbijanja KKS su rana identifikacija i eliminacija inficiranih zapata, dok vakcinacija predstavlja sredstvo podrške (5). Primena vakcina znači prisustvo oboljenja i uvođenje vakcinacije znači gubitak tržišta. Zbog toga vanredna vakcinacija podrazumeva odloženo uništavanje ("delayed-destruction") odnosno odbacivanje mesa vakcinisanih svinja. Vakcinacija se može primeniti u cilju prevazilaženja nedostatka kapaciteta za uništavanje vakcinisanih svinja. Nakon uništavanja vakcinisanih farmi, region se ponovo proglašava slobodnim od KKS (67). Zakonska regulativa EU za KKS dozvoljava vanrednu vakcinaciju kao poslednju meru, ukoliko se širenje virusa ne može zaustaviti primenom postojećih mera (44), jer značajno produžava period zabrane izvoza zbog inkompatibilnosti seroloških metoda dijagnostike i vakcinacije (66). Primenom vakcinacije iz prometa se isključuje meso vakcinisanih jedinki (izuzev termički tretiranog mesa) i međunarodnog prometa 1-2 godine, što predstavlja veliki ekonomski gubitak. Protekle dekade podnošeni su zahtevi

za vanrednu vakcinaciju u EU (1994. godine Nemačka, 1997/98 godine Holandija), ali su odbijeni od komisije EU. U budućnosti etički, epizootiološki, politički i ekonomski razlozi mogu favorizovati vanrednu vakcinaciju K sojem (26). U slučaju velikog broja žarišta KKS, razmatra se dugoročni program vakcinacije (1-2 godine), sa vakcinacijom novorođenih i priplodnih jedinki (86). Vakcinacija subjediničnom vakcinom je preporuka za područja sa velikom gustom populacije svinja ali primena je ograničena na svinje u porastu (92). Problem primene subjediničnih vakcina je što još uvek nije usaglašen postupak sa svinjama nakon vakcinacije (26). Vakcinacija ne može zameniti osnovne mere kontrole bolesti (npr. kontrola prometa) ali može maskirati kliničke znake KKS bez prevencije infekcije i vakcinisani zapati predstavljaju rizik za širenje čak i kada se primenjuje serološka kontrola. Vakcinaciju kao deo kontrolnog programa, treba primenjivati samo određen vremenski period (92).

### **Program kontrole i eradikacije profilaktičkom vakcinacijom protiv KKS**

Sistematska profilaktička vakcinacija primenom atenuisanih vakcina je metoda izbora eradikacije KKS u enzootski inficiranim državama (67). Kontrolnom politikom država koje sprovode vakcinaciju zakonom se propisuje obaveza primene jednog od atenuisanih sojeva virusa ali se najveći broj podataka odnosi na K-soj (54). Vakcinacijom se prekida lanac infekcije i umanjuje broj prijemljivih životinja ali se ne može apsolutno isključiti rizik skrivene infekcije (16). Primena K-soja i neškodljivo uklanjanje inficiranih zapata predstavlja startnu poziciju za eradikaciju (62) ali i prelaznu fazu ka politici nevakcinacije (66). Atenuisane vakcine su metoda izbora, jer su jeftine i efikasne, jedna doza prevenira kliničko oboljenje (38). Međutim, njihova primena nameće zabranu učešća u međunarodnom prometu, jer se imunizovane jedinke serološki ne razlikuju od inficiranih (28).

Atenuisane vakcine se primenjuju u populaciji domaćih svinja u Aziji i južnoj Americi gde postoje različiti proizvodni sistemi (44): ruralni uzgoj svinja, poluzatvoreni i uzgoj na otvorenom, što otežava eradikaciju (80). Infekcija je enzootski prisutna i kruženje virusa se primarno odvija u populaciji svinja malih gazdinstva, što je 34% svinjarske proizvodnje (63). Države centralne i istočne Evrope nastoje da prate politiku nevakcinacije EU, ali KKS sporadično izbija, naročito u politički nestabilnim

državama (66). Karakteristika proizvodnje u istočnoj Evropi i Balkanskom poluostrvu je mali procenat komercijalni farmi, ruralni, porodični uzgoj svinja za sopstvene potrebe ili lokalnu prodaju. Svinje se uzgajaju i slobodno na paši te kontakt sa divljim svinjama nije isključen (6). Situacija u Aziji se poredi sa Evropom pre 1980. godine (90). Na Tajlandu je uprkos primene K-soja, utvrđen porast incidence supakutnog toka KKS (13). Neuspešna vakcinacija protiv KKS je najčešće posledica interferencije kolostralnih antitela i imunološke tolerancije usled neadekvatnih programa imunizacije, sa pojavom atipičnih ili hroničnih infekcija (78). Kontrola imuniteta protiv KKS je kritičan faktor u enzootski inficiranim regionima (62). Kontrolne mere treba da obuhvate i utvrđivanje hronične infekcije u priplodnim zaptatima gde se perzistentnim infekcijama virus KKS održava. Problem je lažan osećaj sigurnosti da vakcinacija štiti od infekcije (12) i posledični propusti u primeni drugih kontrolnih mera, kada se smatra da se vakcinisani zaptati ne mogu inficirati. U enzootski inficiranim vakcinisanim zaptatima, dominiraju slabo virulentni sojevi virusa i infekcija se ne zapaža dok se ne prekine vakcinacija (63). Veliki zaptati obuhvataju prijemčivu prasadi i infekcija se zadržava kod prasadi oko zalučnja (88). Vakcinacija inficiranog zaptata dovodi do supkliničkih i perzistentnih infekcija, kliconošta i širenja virusa KKS jatrogenim putem (63). Utvrđivanje i uklanjanje hronično i/ili perzistentno inficiranih životinja su bitni u programu kontrole (90). Prisustvo perzistentno inficiranih svinja opravdava uništavanje svih životinja u inficiranim zaptatima (17).

Vakcinacija umanjuje ekonomske gubitke i zajedno sa drugim kontrolnim merama predstavlja važnu kariku u eradikaciji oboljenja. Nedostatak je što može omogućiti perzistenciju KKS u enzootski inficiranom u zaptatu. Zbog toga, kako prevalenca oboljenja opada, treba predvideti prestanak vakcinacije i depopulaciju inficiranih zaptata (63).

### **Primena subjediničnih vakcina**

Naučni veterinarski komitet je 1997. godine zvanično preporučio subjedinične vakcine u kontroli KKS, u područjima sa velikom gustom populacije svinja (86) i uključio ih u zakonsku regulativu EU (28). Primena subjediničnih vakcina omogućava utvrđivanje inficiranih jedinki u vakcinisanoj populaciji kao i da se sa izvesnim stepenom sigurnosti tvrdi da je vakcinisana populacija slobodna od KKS, što može



imati za rezultat skraćenje perioda zabrane prometa (3). Prvi put subjedinične vakcine su primenjene u inficiranom području Meksika (57). Terensko ispitivanje je obuhvatalo vakcinaciju zalučene prasadi subjediničnom i atenuisanom vakcinom. Nakon dvokratne vakcinacije subjediničnom vakcinom, nisu utvrđeni klinički znaci oboljenja posle ekspozicije terenskom soju virusa ali su utvrđena antitela protiv E<sup>ms</sup> (58). Utvrđeno je da subjedinična vakcina indukuje solidnu zaštitu na nivou zapata. Međutim, kada imunitet populacije opadne, ponovo izbija KKS. Vakcinacijom inficiranih zapata, mortalitet je opao ali su kod 13% ispitanih utvrđena E<sup>ms</sup> antitela, što potvrđuje mogućnost identifikacije inficiranih jedinki i utvrđivanje stepena infekcije u vakcinisanom zapatu svinja (63). Subjedinična vakcina doprinosi kontroli žarišta KKS ograničavanjem obima, trajanja i umanjenjem ekonomskih šteta u inficiranim područjima ali nije od značaja u vanrednoj vakcinaciji (67). Imunogene karakteristike subjediničnih vakcina su slabe i neophodne su dve aplikacije što nije prihvatljivo u vanrednoj vakcinaciji (47) jer se solidan imunitet mora postići u što kraćem periodu (28). Iako se primenom subjedinične vakcine ne mogu ustanoviti imunotolerantne i hronično inficirane svinje (90) njihova potencijalna primena je pozitivan signal za proizvođače svinja i dobrobit životinja (28).

Subjedinične vakcine omogućavaju primenu jednog novog koncepta kontrole KKS, prilagođenog epizootiološkoj situaciji (28). One se mogu primeniti u prstenastoj vakcinaciji sa D-ELISA testom u kontroli rezidualnih infekcija u enzootski zaraženim državama (24) što bi omogućilo uspostavljanje zona sa prometom živih svinja i proizvoda (12). Prednosti DIVA vakcina su što vakcinacija ne isključuje serološku dijagnostiku infekcije, omogućeno je proučavanje sero-epizootiologije infekcija u vakcinisanoj populaciji i primena kombinovanih programa vakcinacije-eradikacije (89). Međutim, napredak u razvoju DIVA vakcina otežava malo tržište (38). U kontroli KKS, ključno je utvrđivanje inaparentno inficiranih životinja (klinički zdrave kliconoše) (92). Akcenat je na dijagnostičkim testovima ali se smatra da treba izmeniti težište kontrole oboljenja i preći na direktno utvrđivanje prisustva genoma virusa KKS (3).

## 2. 9. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

Na osnovu rezultata genetske tipizacije utvrđene su tri glavne genetske grupe virusa KKS (1, 2, 3) sa po 3 ili 4 subgrupe: 1.1.-1.3., 2.1.-2.3., 3.1.-3.4. (66). Osnov za izdvajanje virusa KKS u genetske grupe je sekvencionirani region 5'NTR, gen koji kodira glikoprotein E2 i region NS5B (87). Za utvrđivanje diverziteta virusa neophodna je reprezentativna kolekcija virusa iz različitih delova sveta, koja se nalazi u referentnoj laboratoriji EU za KKS (Hanover, Nemačka) (39).

Genogrupa 1 obuhvata atenuisane sojeve virusa (1.1. K-soj, 1.2. CS soj), viruse izolovane pre 1964. godine u Evropi (1.1 i 1.2) i novije izolate virusa subgrupe 1.3 (Honduras, Tajland i Malezija). Na Sardiniji i u Rusiji je u novije vreme utvrđena infekcija virusima subgrupe 1.1. (87). Subgrupa 1.2 je utvrđena na Kubi (9) kao i u latinskoj Americi (77).

Izolati virusa iz perioda 1980-tih i 1990-tih godina u Evropi pripadaju genogrupi 2 (2.1.-2.3.) (32). Subgrupa 2.2 (Nemačka, Italija, Švajcarska, Austrija) i 2.3. (Sardinija) je enzootski prisutna u populaciji divljih svinja u Evropi. U istočnoj Evropi utvrđene su subgrupe virusa 2.2. i 2.3. (87). Izolati virusa iz Rumunije u periodu 1994-2007. godine su iz subgrupe 2.3. kao i izolati iz Srbije 1999. godine, Hrvatske i Bugarske (6). Sa izuzetkom dva izolata (Makedonija 2.2. i Hrvatska 2.1.) svi izolati sa područja jugoistočne Evrope su iz subgrupe 2.3. sa visokim procentom (97-100%) identiteta između različitih država i godina. U Aziji je utvrđen najveći diverzitet virusa i izolati iz Kine pripadaju genogrupi 1 i 2 (66). U Tajvanu je u prošlosti ustanovljen subgenotip 3.4. ali su od 1994. godine utvrđeni 2.1. i 2.2. (77). Azijski izolati virusa i jedan izolat iz Velike Britanije čine genogrupu 3 (87).

Genetskom tipizacijom je utvrđeno da genotipovi i subgrupe virusa KKS imaju regionalnu distribuciju. U Kini je utvrđena rekombinacija virusa KKS, što nije iznenađujuće jer je tu smeštena najveća populacija svinja u svetu. Rekombinacija je mehanizam evolucije virusa KKS sa mogućom promenom virulencije (6). Glikoprotein E2 tri genogrupe virusa KKS se genetski i antigeno razlikuje, ali molekularna osnova antigene varijacije nije utvrđena. Genetski diverzitet glikoproteina E2 ima značaj za

razjašnjavanje promene virusa u enzootski inficiranim područjima. Varijabilni region virusa reaguje sa imunološkim sistemom domaćina, što ima za rezultat visok stepen substitucije aminokiselina na antigenim domenima, koje mogu kompromitovati efikasnost vakcinacije u inficiranim područjima. Noviji izolati virusa u poređenju sa ranijim su varijabilniji, što može predstavljati strategiju preživljavanja virusa i adaptaciju na pritisak selekcije (9). Karakterizacija genoma različitih sojeva virusa omogućava analizu njihove filogenetske povezanosti i procenu stepena mutacije (35).

Molekularno genetska ispitivanja omogućavaju utvrđivanje potencijalnog porekla žarišta, srodnost različitih izolata, praćenje širenja i utvrđivanje da li je određeno žarište posledica jednog unosa virusa, kao i diferencijaciju terenskih i vakcinalnih sojeva virusa. Na primer virus koji je prouzrokovao KKS u Španiji 2001-2002. godine je iz subgrupe 2.3., odnosno srodan sa sojevima virusa iz istočno evropskih država. Epizootiološki je utvrđeno da je do izbijanja KKS Španija kupovala prasid iz Holandije. Međutim, u EU je dijagnostikovana slinavka i šap i usledilo je uvećanje prometa sa istočno evropskim državama. Promena puteva trgovine i sličnost sa istočno evropskim sojevima, sugeriše da je virus unet u Španiju ilegalnim transportom (6). Epizootija KKS u Holandiji 1997-98. godine je bila prouzrokovana virusom subgrupe 2.1., koja je do tada sporadično utvrđen u EU. U Velikoj Britaniji 2000. godine je potvrđen virus iz subgrupe 2.1. koji se razlikovao od prethodnih izolata virusa u EU, što ukazuje na nov unos (62). U jugoistočnoj Aziji je enzootski prisutan virus KKS iz subgrupe 2.1., što je utvrđeno genetskim sekvencioniranjem (66). Takodje, utvrđeno je da je virus koji je uzrokovao epizootiju u Južnoj Africi 2005. godine poreklom iz Azije (67).

## 2. 10. DIJAGNOSTIKA KLASIČNE KUGE SVINJA

---

### **Klinički i patomorfološki pregled zapata svinja**

Za dijagnostiku KKS u ranom stadijumu infekcije značajan je klinički pregled zapata (36) kojim se određuje da li i od kojih svinja se vrši uzorkovanje krvi za laboratorijsko ispitivanje (31). Nespecifični klinički simptomi (febra, inapetenca, dijareja) su prvi znaci KKS i mogu biti kriterijum za odabir svinja od kojih se uzorkuje krv (49). Ukoliko se uzorkuje od neinficiranih svinja, KKS se neće dijagnostikovati uprkos kvalitetu laboratorijskih testova. Iz navedenog proizilazi da metoda slučajnog uzorka nije pogodna u dijagnostici KKS (31). Međutim, problem je dijagnostika kongenitalne perzistentne infekcije jer su inficirane svinje klinički zdrave. Takođe, nakon infekcije srednje i slabo virulentnim sojevima virusa dominira supakutni, hronični ili inaparentni tok (33). Uprkos nespecifične kliničke slike, najveći broj žarišta (71%) u Nemačkoj u periodu 1993-1997. godine je utvrđen kliničkim pregledom zapata svinja (36). Tokom epizootije KKS u Holandiji 1997-1998. godine, od 429 žarišta KKS, 325 je utvrđeno kliničkim pregledom (31). Ukoliko je država slobodna od KKS, zakasnela dijagnostika je verovatna. Smatra se da bi u Finskoj, koja je slobodna od KKS od 1917. godine, za dijagnostiku oboljenja u zapatu krmača proteklo 8-12 nedelja (67).

Patomorfološki pregled se obavlja na većem broju uginulih ili žrtvovanih svinja sa znacima karakterističnim za KKS. Iako u ranoj fazi infekcije izostaju izražene patološke promene, patomorfološki pregled je značajan u dijagnostici KKS. U Holandiji 1997-98. godine, prvi inficirani zapati su utvrđeni rutinskim postmortalnim pregledom (31). Sumnja na KKS je veća ukoliko je patolog informisan o mogućnosti izbijanja KKS (39) ali različitost patomorfoloških promena otežava dijagnostiku (38). Osetljivost patološkog nalaza kao dijagnostičke metode je srazmerna veličini ispitanog uzorka. Lažno negativni nalazi odlažu dijagnozu KKS u oko 30% slučajeva. U slučaju da patološki nalaz ne ukazuje na KKS, laboratorijska ispitivanja se obavezno vrše ukoliko klinički nalaz ukazuje na KKS, izostaje reakcija na antibiotski tretman i virus je potvrđen u regionu (31).

### **Biološki ogled**

Uzorci tkiva poreklom od svinja se inokulišu prijemčivim i prasadima vakcinisanim protiv KKS. Nakon toga se prati tok infekcije i ukoliko se klinički ne

ustanovi KKS, ponavlja se veštačka infekcija prethodno inokulisanih, vakcinisanih i prijemčivih prasadi sa virulentnim virusom KKS, u cilju utvrđivanja da li je prasad zaštićena specifičnim antitelima (11).

S obzirom da se Kina soj virusa umnožava u kunićima (4), za diferencijaciju lapiniziranog i terenskog soja virusa KKS vrši se pojedinačna inokulacija oglednih kunića navedenim virusima. Nakon intravenske inokulacije kunića lapiniziranim sojem virusa KKS javlja se febra (porast za 1.5 °C) i sinteza antitela. Kunić je tada imunizovan i ukoliko mu se inokuliše divlji soj virusa KKS, izostaje febra i zaštita od infekcije lapiniziranim sojem (11). Kina soj indukuje pojavu febre samo jednom, 48 časova nakon prve aplikacije. Mogući su lažno pozitivni rezultati usled neprijemčivosti pojedinih kunića na K-soj (28).

### **Dijagnostika *in vitro***

Kontrola populacije u vreme kada nema žarišta infekcije i rana dijagnostika nakon izbijanja KKS, u velikoj meri zavise od pouzdanosti laboratorijske metode (61). Od živih svinja za laboratorijska ispitivanja uzorkuje se krv sa i bez antikoagulansa i brisevi (orofaringealni, tonzilarni, rektalni) dok su od uginulih ili žrtvovanih svinja uzorci izbora tonzile, limfni čvor, slezina i distalni ileum (67). Treba imati u vidu da se uzorkuje mali deo organa i tkiva i ukoliko je virus heterogeno distribuiran, inficirana jedinka može promaći uzorkovanjem pogrešnog dela tkiva. Virus je homogeno distribuiran u svežim uzorcima tonzila, slezini i limfnim čvorovima ali ne i bubrezima (97). Uzorci se transportuju do laboratorije na hladnom bez zamrzavanja i dodavanja konzervansa (88). Za dijagnostička ispitivanja može se uzorkovati i koža, ali je viremija uslov da se virus detektuje u koži. Biopsija kože u dorzolateralnom regionu vrata, u blizini baze uha može biti alternativa *intravitam* dijagnostike u hroničnom i supkliničkom toku KKS (43). Eksperimentalno, vršena su ispitivanja pogodnosti drugih materijala za laboratorijsku dijagnostiku npr. mišićno tkivo, mesni sok (87), jezik i mozak (90).

### **1. Detekcija antigena virusa klasične kuge svinja**

#### **a) Test fluorescentnih antitela (TFA)**

Predstavlja brzu metodu za utvrđivanje antigena virusa KKS u kriostatnim isečcima organa i tkiva. Kriostatski isečci se boje direktno sa anti-KKS

imunoglobulinom konjugovanim sa fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili indirektno primenom sekundarnog FITC konjugata i očitavanjem reakcije upotrebom fluorescentnog mikroskopa (88). Tehnika ima visoku senzitivnost u akutnom toku KKS, ali ista opada u supakutnom i hroničnom toku. Treba imati u vidu da K-soj virusa interferira sa primenom TFA odnosno vakcinisane svinje daju pozitivan nalaz do 14 dpv (45). Ukoliko se za TFA primene anti-pestivirus poliklonska antitela, na uzorcima svinja inficiranih pestivirusima preživara mogu se dobiti lažno pozitivni nalazi (67) i neophodna je primena monoklonskih antitela za utvrđivanje da li fluorescencija potiče od antigena virusa KKS, BVDV ili BDV (39).

#### **b) Imunoperoksidaza test - diferenciranje pestivirusa primenom monoklonskih antitela**

U ovom testu se primenjuje set od tri konjugovanih monoklonskih antitela koja se vezuju za antigene terenskih i vakcinalnih sojeva virusa KKS i pestiviruse preživara. Preduslov je da monoklonska antitela za virus KKS "raspoznaju" terenske sojeve i da anti-vakcinalna monoklonska antitela prepoznaju vakcinalne sojeve virusa primenjene u datoj državi. Primena monoklonskih antitela za diferenciranje vakcinalnog soja virusa KKS se izostavlja u područjima gde se ne vrši vakcinacija svinja (14).

#### **c) Imunoenzimski (ELISA) test (Antigen-capture assay)**

Imunoenzimskim testom se utvrđuje prisustvo antigena virusa KKS u uzorcima nezgrušane krvi, plazme, seruma, organa i tkiva (25). Utvrđivanje antigena virusa u krvi (viremija) je metoda izbora u ranoj fazi infekcije. Test se primenjuje u kontroli na nivou zapata (39) ali ne i u individualnoj dijagnostici KKS (na primer, promet) (25). Postoji nekoliko ELISA testova na principu „double sandwich“ metode sa primenom monoklonskih ili poliklonskih antitela protiv različitih proteina virusa. Imunoenzimski testovi imaju nižu specifičnost i osetljivost, naročito u dijagnostici infekcija uzrokovanih slabo virulentnim sojem virusa KKS. Nedostatak specifičnosti se ne smatra značajnim jer je viremija sa BVDV i BDV redak nalaz. Na rezultate testa utiče prisustvo specifičnih antitela u ispitujućem materijalu (87). Imunoenzimski test predstavlja brzu i jednostavnu metodu, sa mogućnošću automatizovane obrade na velikom broju uzoraka (66).

## 2) Izolacija virusa

Izolacija virusa na kulturi tkiva predstavlja "zlatni standard" laboratorijske dijagnostike KKS (61). Najčešće korišćene kulture tkiva su ćelijske linije svinjskih bubrega (PK15, SK6) i svinjskih testisa (STE). Nakon inokulacije materijala u ćelijsku liniju virus se replikuje u citoplazmi, ali ne dovodi do nastanka CPE (5) pa se primenjuju indirektno metode detekcije virusnih antigena kao na primer, tehnika fluorescentnih antitela (TFA) (67). Tonzile, limfni čvorovi, slezina, nezgrušana krv i ćelijske komponente krvi (leukociti) su materijal izbora ali je izolacija virusa iz čvrstog limfoidnog tkiva (tonzile, limfni čvorovi) osetljivija (87). Ukoliko su uzorci čuvani na sobnoj temperaturi, slezina je manje pogodan uzorak, jer je osetljiva na autolitične procese i sadrži velike koncentracije endogenih RNKaza (97). Bez obzira na vrstu tkiva, nakon infekcije slabo virulentnim sojem, mogući su lažno negativni rezultati (90). Ukoliko su u materijalu prisutna specifična antitela, ona maskiraju infektivnost virusa u kulturi tkiva (95), inhibirajući i/ili usporavajući umnožavanje virusa (87). Vreme potrebno za dobijanje rezultata (2 - 4 pa i do 7 dana) je glavni nedostatak metode i često su neophodne multiple pasaže (do 3, jedna nedeljno) (90). Sa druge strane, omogućeno je ispitivanje osobina sojeva virusa (npr. određivanje virulencije) (39) i genotipizacija (5).

Od metoda laboratorijske dijagnostike KKS primenjuju se još i: avidin-biotin kompleks monoklonski test (5), imunohistohemijska tehnika (IHC) tj. ustanovljavanje glikoproteina E2 u fiksiranim (formalin) parafinskim isečcima tkiva primenom monoklonskih antitela baziranih na imunoperoksidaznoj metodi avidin-biotin-kompleksa (ABC) (14) i tehnika *in situ* hibridizacije (39).

## 3) Detekcija genoma virusa klasične kuge svinja

Utvrđivanje prisustva virusne RNK vrši se amplifikacijom 5`NTR genoma virusa KKS i sekvencioniranjem nukleotida direktno na amplifikacionim produktima pri čemu je omogućena i identifikacija soja virusa (99). Razlikuje se standardna tehnika reverzne transkripcije lančane reakcije polimeraze (RT-PCR), real-time RT-PCR (rRT-PCR), RT-nested PCR (RT-nPCR) i multipleks RT-PCR (RT-MRT-PCR) (39).

Tehnika RT-PCR za utvrđivanje prisustva virusne RNK u krvi se može primeniti na zbirnim uzorcima i u prekliničkoj dijagnostici (25). Lažno negativni rezultati nastaju ukoliko se nukleinska kiselina degradira ili reakciona mešavina sadrži inhibitore. Lažno

pozitivni rezultati su posledica kontaminacije uzoraka, hemikalija ili opreme (39). Primena RT-PCR ima prednost u dijagnostici KKS, naročito nakon infekcije slabo virulentnim sojevima virusa (47). Takođe, ova metoda omogućava utvrđivanje prisustva virusne RNK u autolizovanim uzorcima i tkivu fiksiranom u formalinu, što je prednost kada nema svežih uzoraka (67). Za RT-PCR je neophodno prisustvo samo ciljnog regiona genoma u uzorku i antitela koja prekrivaju virusnu partikulu ne utiču na rezultat. Metoda je specifična i brza (kraće od 1 dan) ali je nedostatak što nije prilagođena velikom broju uzoraka u kratkom vremenskom periodu (40). Automatizovana metoda ekstrakcije RNK bi omogućila kontrolu velikog broja uzoraka (npr. kontrola na liniji klanja) i umanjila rizik kontaminacije u odnosu na manuelnu izolaciju RNK (39).

Tehnika RT-nPCR predstavlja RT-PCR nakon kojeg sledi drugi PCR i smatra se najosetljivijom *in vitro* metodom detekcije virusa KKS (14). Primenom RT-nPCR prisustvo virusa KKS u krvi se može u proseku utvrditi 2.8 dana ranije u odnosu na izolaciju virusa, čime je omogućeno rano utvrđivanje infekcije kod živih jedinki (25). U EU je RT-nPCR prihvaćena kao metoda zvanične potvrde KKS (87). Opisano je nekoliko tehnika rRT-PCR za dijagnostiku KKS: direktno obeležavanje RT-qPCR produkata primenom SYBR green i indirektni RT-qPCR primenom TaqMan proba (39). Prednost rRT-PCR u odnosu na konvencionalni RT-PCR je kvantitativno izražavanje postignutih rezultata (99). Infekcija se utvrđuje ranije i duži vremenski period tehnikom rRT-PCR u poređenju sa izolacijom virusa (40). Problem sa aspekta interpretacije su pozitivni rezultati rRT-PCR koji se ne potvrde izolacijom virusa, i mogući su na početku infekcije i u fazi rekonvalescencije (39). Kvantitativnim real time-PCR (qRRT-PCR) omogućava određivanje koncentracije virusa u sekretima i ekskretima (95). Visoka osetljivost i specifičnost, nizak nivo kontaminacije, brzina izvođenja i mogućnost kontrole velikog broja uzoraka su glavne prednosti metode (39). Pored toga, proizvodi testa se mogu sekvencionirati i koristiti u tipizaciji virusa (14). Razvijen je rRT-PCR za K-soj virus („Riems“) i u uzorcima oralno vakcinisanih divljih svinja, potvrđeno je prisustvo genoma K-soja u krvi (54).

Multipleks RT-PCR (RT-MRT-PCR) omogućava istovremeno utvrđivanje većeg broja patogena u jednom uzorku. Primenom rRT-MRT-PCR mogu se identifikovati inficirane svinje u vakcinisanoj populaciji. Međutim, razvoj uniformnog sistema za sve vakcinalne sojeve nije moguć (99).



#### **4. Serološka dijagnostika**

Utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa KKS nije od značaja u ranoj dijagnostici (25) jer se antitela ustanovljavaju relativno kasno nakon infekcije (14-21 dpi). Sa druge strane, serološka dijagnostika je imperativ za države međunarodno priznate kao slobodne od KKS jer ukazuje na prisutvo infekcije (39). U interpretaciji seroloških rezultata, treba imati u vidu da svinje inficirane visoko virulentnim sojem virusa uginu pre utvrđivanja imunološkog odgovora. Svinje inficirane *in utero* su imunološki tolerantne za virus KKS i seronegativne (97). Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa KKS primenjuje se virus neutralizacioni test (VNT) i imunoenzimski testovi (ELISA) (39).

##### **Virus neutralizacioni test (VNT)**

Metoda predstavlja „zlatni standard“ serološke dijagnostike (39) i primenjuje se u individualnoj dijagnostici (međunarodni promet) i identifikaciji inficiranih zapata (25). Ispitujući serum se inkubira sa referentnim virusom KKS i ukoliko uzorak sadrži specifična antitela protiv KKS, neutrališe se test virus (61). Izbor test virusa se može modifikovati, u skladu sa epizootiološkom situacijom npr., uključenjem sojeva virusa izolovanih u državi. Test je zahtevan za izvođenje i traje 2-3 dana i duže, ne može se automatizovati, nije pogodan za veliki broj uzoraka i ne razlikuje se titar antitela nakon infekcije od antitela nakon vakcinacije atenuisanim sojem virusa KKS (39). Kontaminirani serum se ne mogu testirati usled toksičnog dejstva na kulturu tkiva. Test je osetljiviji od ELISA tehnike i utvrđuje specifična antitela 10-14 dpi ali ima srednji stepen osetljivosti za utvrđivanje niskog titra antitela u kasnoj fazi infekcije (5). U zapadnoj Evropi najviše se primenjuje test neutralizacije peroksidaze (NPLA) dok se u severnoj i latinskoj Americi primenjuje imunoperoksidazni monolojer test (IPMA). U Aziji se primenjuje test egzaltacije virusa Newcastle bolesti primenom neutralizacione END metode (14). Serološku dijagnostiku KKS komplikuje antigena srodnost i unakrsna reaktivnost sa BVDV i BDV (lažno pozitivni rezultati). U cilju diferencijacije, vrše se komparativni pregledi VNT i analizira utvrđena razlika u visini titra antitela na KKS, BVDV i BDV (97).

##### **Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA test)**

Imunoenzimskim testom se utvrđuje prisustvo specifičnih antitela protiv E2 glikoproteina virusa (32). Razlikuje se indirektna i kompetitivna ili bloking (CTB)

ELISA. Testom treba da se utvrde antitela što ranije nakon infekcije i u tom pogledu najbolja je indirektna ELISA koja je osetljivija ali i manje specifična od bloking ELISA testa (39). Ispitivanja ELISA testom se primenjuju nakon izbijanja KKS u regionima gde se ne vrši imunoprofilaksa atenuisanim vakcinama, pri sumnji da je region enzootski inficiran (36) i u kontroli vakcinacije divljih svinja (44). Test je pogodan za kontrolu velikog broja uzoraka (39) ali nije apsolutno specifičan (66). Antitela protiv BVDV i BDV mogu interferirati i pozitivni nalazi se potvrđuju testom NPLA primenom soja virusa KKS, BVDV ili BDV karakterističnih za region (82). Specifična antitela nakon vakcinacije K sojem virusa KKS su ustanovljena najranije 9 dpv (VNT) odnosno ELISA testom 11 dpv (92). Pri niskim vrednostima titra antitela u serumu ELISA test ima manju osetljivost dok je ista dobra pri srednjim vrednostima titra antitela (32). Nedostaci ELISA testa ne predstavljaju problem ukoliko se dijagnostika vrši na velikom broju uzoraka (kontrola zapata) (25).

#### **Diferencijalno dijagnostički imunoenzimski E<sup>ms</sup> test (D-ELISA)**

Diferencijalno dijagnostički ELISA test predstavlja prateći test za subjediničnu E2 vakcinu (32) čijom primenom je omogućeno utvrđivanje inficiranih jedinki u vakcinisanim zapatima (57). Subjedinične vakcine indukuju sintezu antitela protiv glikoproteina E2 virusa KKS i E2-ELISA testom se vrši kontrola antitela indukovanih vakcinacijom dok se D-ELISA testom utvrđuju antitela protiv glikoproteina E<sup>ms</sup> i u slučaju pozitivnog nalaza, životinja se smatra inficiranom virusom KKS. Na tržištu postoje dva D-ELISA testa i oba su slabije osetljivosti u poređenju sa konvencionalnom ELISA testom (39). Prva zvanična testiranja postojeća dva D-ELISA testa su obavljena 1999. godine kada je utvrđen problem specifičnosti i osetljivosti. Tokom 2003. godine, vršena su dodatna ispitivanja u cilju procene performansi novih verzija D-ELISA testova. Iako je poboljšana specifičnost i osetljivost, postoji potreba za pouzdanijim testovima u cilju utvrđivanja da vakcinisana svinja nije kliconoša (92). Osetljivost D-ELISA testa je prihvatljiva ukoliko se primenjuje na ceo zapat (57). Marker proteini su slabo imunogeni (3) i E<sup>ms</sup> antitela se detektuju u proseku 17.2 dpi (24). Kod svinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom i veštački inficiranih slabo virulentnim sojem virusa, E<sup>ms</sup> antitela se prvi put mogu da dokažu 14 dpi. Vakcinisane svinje koje prežive infekciju, imaju rastući titar antitela od 21 dpi i kontinuirano najmanje 7 meseci pozitivan nalaz D-ELISA testom (32). Intermitentno utvrđivanje E<sup>ms</sup> antitela je opisano

kod hronično inficiranih svinja (17), što se objašnjava manjom osetljivošću testa (32). Proteini virusa KKS, uključujući E<sup>ms</sup>, imaju epitope zajedničke sa drugim pestivirusima što otežava razvoj marker serologije (66). Diferencijalnim ELISA testom se utvrđuje i prisustvo specifičnih antitela protiv BDV i BVDV (lažno pozitivni nalazi) (5) i primena se ne preporučuje u regionima sa visokom prevalencom BVDV i BDV infekcija svinja (48). Oba D-ELISA testa daju lažno negativne rezultate testiranjem referentnih seruma proizvedenih sa sojem Alfort 187, koji nije utvrđen u EU tokom poslednje dekade i seruma dobijenih primenom vakcine u kojoj se nalazi K-soj virusa. Smatra se da D-ELISA testove treba validovati testiranjem novih izolata virusa. Identifikacija vakcinisanih inficiranih jedinki je osnovni kvalitet marker vakcinacije i preduslov prometa životinja i mesa. Problem je što ne postoji serološki test koji bi verifikovao rezultate D-ELISA testa (32). S obzirom da se genom virusa KKS kod inficiranih svinja može utvrditi do 63 dpi, predložena je primena PCR kao potvrdnog testa za pozitivne nalaze D-ELISA testa (54).

### **Laboratorijska dijagnostika divljih svinja**

U kontrolnoj strategiji KKS divljih svinja, treba imati u vidu mogućnosti i ograničenja laboratorijske dijagnostike. Ne postoje biološke razlike u dijagnostici KKS divljih i domaćih svinja ali je problem loš kvalitet uzorka i interpretacija rezultata. U sumnjivim slučajevima predložena je primena RT-PCR i izolacije virusa. Imunoenzimski testovi za utvrđivanje antigena i antitela protiv virusa se primenjuju u toku epizootije ili enzootske infekcije, kada je njihova osetljivost prihvatljiva. Kvalitet uzorka (autoliza) interferira sa kulturom tkiva u VNT i izolaciji virusa (citoksično dejstvo) pa se ova metoda primenjuje samo kao potvrdni test u slučaju pozitivnog nalaza ELISA testa (5). Limfna tkiva su najpogodnija za dijagnostiku (tonzila, limfni čvor, slezina) dok se u slučaju uznapredovale autolize preporučuje kao uzorak treći očni kapak (*membrana nicticans*) jer je manje zahvaćen autolizom nego interni organi i lako se uzorkuje (79). Čak 30% - 50% uzoraka divljih svinja može biti neodgovarajuće za laboratorijska ispitivanja zbog uznapredovale putrefakcije i destrukcije virusa (1). Tehnika RT-PCR je manje osetljiva na raspadanje tkiva (97) i omogućava dijagnostiku i genetsko sekvencioniranje virusa KKS u cilju praćenja infekcije u populaciji divljih svinja (1).

### 3. CILJ I ZADACI RADA

---

Cilj ispitivanja je da se ustanovi da li kod prasadi uzrasta 45 dana, koja su poreklom od vakcinisanih krmača, posle vakcinacije sa atenuisanom (Kina-soj) i subjediničnom (E2) vakcinom protiv KKS, dolazi do interferencije kolostralnog imuniteta sa sintezom sopstvenih antitela. Pored toga, cilj je da se ustanovi da li postvakcinalni imuni odgovor kod ovih prasadi, sprečava pojavu oboljenja, izlučivanje virusa KKS i dalje širenje bolesti (sprečavanje pojave sekundarnih žarišta oboljenja).

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja formulisani su sledeći zadaci:

- ispitati prisutvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u krvnim serumima prasadi uzrasta 43 dana poreklom od krmača višekratno vakcinisanih K-sojem virusa
- ispitati da li će se javiti, u kojoj grupi, kada i koliko će trajati klinički znaci KKS nakon veštačke infekcije prasadi
- kontinuirano ispitivanje serološkog statusa eksperimentalne prasadi tj. dinamiku perzistencije specifičnih antitela protiv virusa KKS nakon veštačke infekcije
- ispitati da li će se javiti, u kojoj grupi, kada i koliko će trajati viremija posle veštačke infekcije prasadi
- ispitati da li će nastupiti, kada i u kojoj grupi izlučivanje virusa KKS nakon veštačke infekcije prasadi kontrolom orofaringealnog i rektalnog brisa na prisustvo virusne RNK
- ispitati da li će se, u kojoj grupi i kada javiti klinički znaci oboljenja posle moguće horizontalne infekcije nevakcinisane prasadi u direktnom kontaktu
- ispitati da li će se javiti, u kojoj grupi, kada i koliko će trajati viremija posle moguće horizontalne infekcije nevakcinisanih prasadi u direktnom kontaktu
- ispitati da li će se javiti, kada i u kojoj grupi specifična E<sup>ms</sup> antitela protiv virusa KKS kod nevakcinisanih jedinki u direktnom kontaktu
- nakon uginuća ili žrtvovanja, izvršiti patomorfološki pregled i ustanoviti patomorfoške promene
- ispitati prisustvo i ustanoviti distribuciju antigena virusa KKS odnosno virusne RNK u organima i tkivima eksperimentalne prasadi.

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

---

### 4.1. MATERIJAL

#### 4.1.1. Ogledne životinje

Ogledna istraživanja su obavljena na ukupno 60 eksperimentalnih životinja - prasadi, rase-melezi (Švedski Landras × Veliki Jorkšir), uzrasta 45 dana. Sa imunološkog aspekta razlikuju se dve kategorije eksperimentalnih životinja: nevakcinisana prasad poreklom od nevakcinisanih krmača (ukupno 18 prasadi) i nevakcinisana prasad poreklom od krmača višekratno vakcinisanih vakcinom koja sadrži K-soj virusa KKS (ukupno 42 praseta).

Kriterijumi koje su morala da zadovolje prasad poreklom od krmača vakcinisanih protiv KKS:

- da su prasad poreklom sa svinjarske farme koja vrši kontinuiranu imunoprofilaksu priplodnih jedinki odnosno, vakcinacija krmača K-sojem virusa KKS se obavlja po programu mera (kao prase 45. i revakcinacija 90. dana života; jednom kao nazimica pri odabiru za pripust i u svakoj laktaciji, 10-15 dana pre zalučenja).
- prasad u okviru svake grupe moraju biti odabrana metodom slučajnog izbora
- da su zdrava, dobre telesne kondicije, slobodni od ekto i endoparazita
- da u krvi nisu ustanovljena antitela protiv virusa BVD i
- da u krvi nije utvrđen antigen virusa KKS

Kriterijumi koje su morala da zadovolje prasad poreklom od nevakcinisanih krmača:

- da potiču od krmača koje nisu vakcinisane protiv KKS
- da nisu vakcinisane protiv KKS
- da su slobodna od specifičnih antitela protiv virusa KKS
- da su zdrava, dobre telesne kondicije, slobodni od ekto i endoparazita
- da u krvi nisu ustanovljena antitela protiv BVD virusa
- da u krvi nije utvrđen antigen virusa KKS

#### 4.1.2. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalna ispitivanja su podeljena u dve faze: u prvoj fazi izvršena su ogledna ispitivanja sa primenom atenuisane (K-soj) vakcine dok je druga faza obuhvatala ispitivanja primenom subjedinične (marker) vakcine.

U cilju ustanovljavanja prisustva kolostralnih antitela u serumu prasadi poreklom od krmača višekratno vakcinisanih vakcinom koja sadrži K-soj virusa KKS, izvršeno je vađenje krvi kod 100 prasadi uzrasta 43 dana. Na osnovu rezultata seroloških ispitivanja, formirane su tri eksperimentalne grupe prasadi. Prva grupa je obuhvatala prasad kod kojih je ustanovljeno prisustvo kolostralnih antitela, druga grupa je obuhvatala prasad kod kojih nije ustanovljeno prisustvo kolostralnih antitela i treća grupa je obuhvatala jedinke kod kojih su antitela ustanovljena na granici detektabilnosti odnosno kod kojih je ustanovljen sumnjiv nalaz na prisustvo kolostralnih antitela.

Nakon izbora prasadi koja su ispunjavala navedene preduslove, izvršeno je njihovo obeležavanje i formirane su eksperimentalne grupe. Usledilo je dopremanje prasadi u eksperimentalno dijagnostički blok Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ (NIV-NS) i period aklimatizacije (7 dana). Tokom perioda aklimatizacije svakodnevno je vršen klinički pregled i termometriranje prasadi i u tom periodu životinje su bile klinički zdrave.

U prvoj fazi ispitivanja (atenuisana K-soj vakcina) na osnovu dobijenih rezultata seroloških ispitivanja, metodom slučajnog uzorka formirane se tri grupe od po 7 prasadi (pozitivna br. 1-7, negativna br. 8-14 i sumnjiva grupa br. 15-21) i u okviru svake grupe u uzrastu od 45 dana obavljena je vakcinacija prasadi atenuisanom vakcinom (K-soj virusa KKS), intramuskularnom (i/m) aplikacijom, po uputstvu proizvođača vakcine.

Četrnaest dana nakon vakcinacije obavljena je veštačka infekcija prasadi, i/m aplikacijom virulentnog Beker soja virusa KKS (2 ml, titra  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> ml). Jedan dan nakon veštačke infekcije u cilju provere izlučivanja virusa, u svaku grupu su dodana po 2 neimuna praseta (br. S1 i S2, br. S3 i S4, br. S5 i S6), poreklom od nevakcinisanih krmača. Navedene tri eksperimentalne grupe prasadi su smeštene u tri zasebne jedinice u okviru eksperimentalno dijagnostičkog bloka NIV-NS.

U drugoj fazi eksperimentalnih istraživanja (subjedinična vakcina), na osnovu dobijenih rezultata seroloških ispitivanja, metodom slučajnog uzorka formirane su tri grupe od po 7 prasadi: pozitivna (br. 22-28), negativna (br. 29-35) i sumnjiva grupa (br. 36-42) i u okviru svake grupe u uzrastu od 45 dana obavljena je vakcinacija i nakon 4 nedelje revakcinacija prasadi sa subjediničnom vakcinom, i/m aplikacijom 2 ml, u skladu sa uputstvom proizvođača vakcine. Subjedinična vakcina (Porcilis<sup>®</sup>Pesti, Intervet International B.V.) sadrži glikoprotein E2 soja Alfort187/Tübingen virusa

KKS. Četrnaest dana nakon revakcinacije obavljena je veštačka infekcija prasadi, i/m aplikacijom virulentnog Beker soja virusa KKS (i/m, 2 ml, titra  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> ml). Jedan dan nakon veštačke infekcije a u cilju provere izlučivanja virusa u svaku grupu dodana su po 2 neimuna praseta, poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S7 i S8; br. S9 i S10; br. S11 i S12). Navedene tri eksperimentalne grupe prasadi su smeštene u tri zasebne jedinice u okviru eksperimentalno dijagnostičkog bloka NIV-NS.

Kontrolna grupa je obuhvatala 6 nevakcinisane prasadi (br. K1, K2, K3, K4, K5 i K6) poreklom od nevakcinisane krmače koja su veštački inficirana po istom modelu kao i prethodne grupe prasadi (Beker soj virusa KKS, i/m, 2 ml, titra  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> ml). Prasad kontrolne grupe su smeštena u zasebnu komoru eksperimentalno dijagnostičkog bloka.

Nakon veštačke infekcije svih navedenih grupa prasadi, obavljana je kontinuirana klinička opservacija koja je obuhvatala svakodnevno merenje telesne temperature i evidentiranje kliničkih simptoma oboljenja.

#### **4.1.3. Uzorci krvi, krvnih seruma, briseva i organa**

Pre dopremanja odnosno prilikom odabira prasadi izvršeno je ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa BVD, specifičnih antitela protiv virusa KKS, kao i prisustva antigena virusa KKS u organizmu eksperimentalne prasadi.

Od dana kada su prasad veštački inficirana, u cilju kontrole prisustva virusa KKS u krvi (viremija) i specifičnih antitela protiv virusa KKS, od svakog praseta vršeno je uzorkovanje krvi po sledećem programu: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 i 28. dana nakon veštačke infekcije (dpi). Uzorkovanje krvi je vršeno iz brahiocefaličnog plexusa (5 ml), uz dodatak antikoagulansa (EDTA) kada je uzorak ispitivan na prisustvo antigena i genoma virusa KKS. Ukupno je tokom oglada uzorkovano 794 uzoraka nezgrušane krvi i 894 uzoraka krvnih seruma, koji su čuvani zamrznuti (- 80 °C), do ispitivanja.

U cilju kontrole izlučivanja virusa KKS iz organizma vakcinisanih i veštački inficiranih prasadi vršeno je uzimanje orofaringealnog (ORF) i rektalnog (RE) brisa u dvodnevnom intervalima: 0, 2, 4, 6, 8 i 10 dpi. U epruvetice sa brisom je pre uzorkovanja sipan fiziološki rastvor (PBS pH 7.2). Ukupno je tokom oglada uzorkovano 410 uzoraka briseva, koji su čuvani zamrznuti (- 80 °C), do ispitivanja.

Kod uginule prasadi obavljena je obdukcija i patomorfološki pregled svih organa. Tridesetog dana nakon veštačke infekcije izvršeno je žrtvovanje preživelih 47 jedinki (intrakardijalna aplikacija T61 - Intervet International®). Nakon žrtvovanja obavljena je obdukcija, patomorfološki pregled i uzorkovanje organa za laboratorijski pregled na prisustvo i distribuciju virusa KKS i to: slezina, bubreg, terminalni ileum, mandibularni limfni čvorovi i tonzile. Ukupno je uzorkovano 300 organa. Uzorci tkiva za ispitivanje ELISA testom i RT-PCR tehnikom su čuvani zamrznuti (- 80°C), do pregleda.

#### **4.1.4. Eksperimentalno dijagnostički blok**

Prasad iz ogleda su smeštena u odgovarajućem broju jedinica eksperimentalno dijagnostičkog bloka Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad". Svaka od ovih jedinica raspolaže dobro izolovanim smeštajnim prostorom od oko 30 m<sup>3</sup> (4,00 x 2,95 x 2,55) namenjenim eksperimentalnom radu na životinjama. Komunikacija prostora sa spoljašnjom sredinom odvija se isključivo preko dobro zaptivajućih, termoizolovanih vrata od metalnih kutijastih profila i tri odeljka (predvorja) koje čine: a) garderoba I (ulazna) sa dezbarijerom, mestom za odlaganje lične odeće i obuće radnika u neposrednom radu sa životinjama; b) tuš kupatilo i c) garderoba II za smeštaj i oblačenje radne odeće i obuće neposredno pred ulazak u smeštajni prostor sa životinjama. Direktni kontakt između dve jedinice nije moguć.

U smeštajnom prostoru za životinje, u okviru svake jedinice postoji izvor tekuće vode, odgovarajući broj hranidbenih mesta i delimično rešetkasti pod za odvođenje urina i fecesa. Za svaku jedinicu je obezbeđena zasebna prostirka (piljevina), koja je prilikom čišćenja ispirana u postojeći bazen ispod nivoa poda, zaseban za svaku eksperimentalnu jedinicu. Smeštajni prostori su zagrevani električnim kaloriferskim uređajima čije funkcionisanje reguliše termostat i dodatno električnim sijalicama (Tungsram, Infrasec 250W).

Na ulazu u svaku jedinicu su postavljene dezbarijere (3% NaOH), gumene čizme i radni kombinezon za jednokratnu upotrebu, čime su preduzete mere za sprečavanje mehaničkog prenošenja virusa iz jedne u drugu jedinicu, kao i eventualno širenje virusa iz eksperimentalnog bloka u spoljašnju sredinu. Obilazak jedinica je uvek vršen tako da se prvo polazi od komore sa prasadima koja nisu pokazivala kliničke simptome KKS



(bez pojave oboljenja) do komore sa klinički obolelim jedinkama. Prasad su hranjena po volji (grover) sa prosečnom koncentracijom proteina od 18%. U okviru svake jedinice je obezbeđen poseban smeštajni prostor za džakove s hranom, kao i neophodnim materijalom za rad: rukavice za jednokratnu upotrebu, termometri, sterilni špricevi i igle za jednokratnu upotrebu. Sav materijal i oprema koji su bili neophodni u radu sa eksperimentalnim životinjama je bio obezbeđen za svaku jedinicu zasebno.

## **4.2. METODE**

### **4.2.1. Klinički i patomorfološki pregled**

Tokom perioda aklimatizacije svakodnevno je vršen klinički pregled i merenje telesne temperature svih eksperimentalnih životinja u ogledu. Fiziološka vrednost telesne temperature kod zalučene prasadi (TM 9-18 kg) iznosi 39.3 °C (87). Nakon eksperimentalne infekcije povišena telesna temperatura je definisana kao rektalna temperatura > 40.0 °C (23). Kliničkim pregledom su bili obuhvaćeni sledeći simptomi: apetit, živahnost (apatija, letargija), eritem, cijanoza i pojava krvarenja na koži, konjunktivitis, kašalj, opstipacija/dijareja, telesna kondicija (kaheksija), lokomotorni poremećaji, ataksija, poremećaji funkcije CNS-a (pareza, paraliza, konvulzije).

Nakon uginuća i/ili žrtvovanja prasadi u ogledu, vršen je detaljan patomorfološki pregled svih organskih sistema i beležene su sve ustanovljene makroskopske patološke promene u okviru grupa.

### **4.2.2. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa klasične kuge svinja**

Imunoenzimski test (ELISA test) za ustanovljavanje antitela protiv virusa klasične kuge svinja (Komerčajni ELISA set kit: Classical Swine Fever Virus Antibody Test Kit, HerdChek\* CSFVAb, proizvođača: IDEXX Laboratories, USA)

#### **Princip testa**

Primenjenim ELISA testom utvrđuje se prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u krvnom serumu ili plazmi. Test je "bloking" ELISA koja se izvodi u mikrotitracionim pločama na kojima je vezan antigen virusa KKS. Ukoliko su u ispitujućim uzorcima prisutna antitela, ona blokiraju vezivanje specifičnih

monoklonskih antitela protiv virusa KKS obeleženih peroksidazom. Vezana monoklonska antitela se detektuju supstratom. Razvijanje boje pokazuje dobijeni rezultat. Optička gustina (OD) se meri čitačem na talasnoj dužini od 450 nm ili dvostruko na 450 i 620 nm. Razvijanje slabe boje označava da su specifična antitela protiv virusa KKS prisutna u uzorku (pozitivan rezultat). Maksimalni intenzitet boje ukazuje na odsustvo specifičnih antitela u uzorku (negativan rezultat). Rezultat se izražava u procentu blokiranja koji se dobija obračunom iz optičke gustine uzorka i optičke gustine negativne kontrole.

**Test obuhvata sledeće komponente:**

1. Mikrotitraciona ploča čiji su bazenčići pokriveni sa antigenom virusa KKS;
2. 480 ml rastvora za ispiranje, 10 x koncentrovan;
3. 1 ml negativne kontrole;
4. 1 ml pozitivne kontrole;
5. 45 ml razređivača za uzorak;
6. 60 ml anti-KKS virus: HRPO konjugata;
7. 60 ml supstrat rastvora (TMB);
8. 60 ml Stop rastvora i
9. Rezultati su analizovani uz pomoć: „Global Animal Health Monitoring Software, xCheck™ Software, IDEXX Production animal services“.

**Priprema reagenasa:**

1. Rastvor za ispiranje je koncentrovan, tako da se prvo stavlja na sobnu temperaturu i vrši se njegovo razređivanje sa redestilovanom vodom u odnosu 1:10. Kada se pripremi u sterilnim uslovima, rekonstituisan rastvor se može čuvati uskladišten nedelju dana na temperaturi od 2 do 8 °C.
2. Ukoliko se u koncentrovanom rastvoru za ispiranje zapaze nastali kristali, bocu sa rastvorom treba ostaviti u toploj vodi najmanje 30 minuta.

**Priprema uzoraka:**

Testiranje se može vršiti na svežim, zamrznutim ili uzorcima seruma ili plazme uskladištenim ne duže od 8 dana na temperaturi od 4 °C.

### **Test procedura:**

Pre upotrebe, svi reagensi se drže na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u trajanju od najmanje jedan sat. Reagense treba blago protresti nežnim obrtanjem rukom ili pomoću vorteksa.

1. U svako udubljenje mikrotitracione ploče i u kontrolna udubljenja se unese 50  $\mu\text{L}$  razređivača za uzorak.
2. U odgovarajuća udubljenja, unosi se 50  $\mu\text{L}$  pozitivne i negativne kontrole u duplikatu. Za različite kontrole se ne koristi isti nastavak pipete.
3. U preostala udubljenja se dodaju uzorci za ispitivanje (serum), pri čemu se za svaki ispitujući uzorak koristi drugi nastavak pipete.
4. Ploča se lagano protrese u cilju ravnomernog mešanja sastojaka u udubljenjima.
5. Mikrotitraciona ploča se inkubira u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u vremenu od 2 sata ili preko noći na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori.
6. Posle završene inkubacije, udubljenja mikrotitracione ploče se prazne i ispiraju 3 puta sa 300  $\mu\text{L}$  rastvora za ispiranje, pri čemu se svako udubljenje prilikom ispiranja u celini isprazni i nakon toga puni do vrha. Nakon ispiranja, ostatak tečnosti se otesa na papirnu vatu.
7. U svako udubljenje mikrotitracione ploče se unosi 100  $\mu\text{L}$  anti-KKS virus HRPO konjugata i inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi ili u vlažnoj komori.
8. Nakon 30 minuta ponavlja se pranje ploče, kao što je opisano pod tačkom 6. U svako udubljenje mikrotitracione ploče se unosi 100  $\mu\text{L}$  supstrat rastvora i inkubira 10 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Merenje vremena otpočinje nakon punjenja prvog udubljenja.
9. Reakcija se zaustavlja nakon 10 minuta dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  stop rastvora u svako udubljenje mikrotitracione ploče. Stop rastvor se dodaje po istom redosledu kao i supstrat (tačka 8).
10. Očitavanje reakcije uzoraka i kontrola se vrši spektrofotometrom (čitačem) na talasnoj dužini od 450 nm ili dvostruko na 450 i 620 nm.
11. Nakon toga se izračunava vrednost optičke gustine (OD) za svaki ispitani uzorak i za kontrole.

### **Izračunavanje srednje vrednosti optičke gustine (OD)**

Izračunava se srednja vrednost optičke gustine uzoraka ( $OD_{TEST}$ ), pozitivne ( $OD_{POS}$ ) i negativne kontrole ( $OD_{NEG}$ ) koji se postavljaju u duplikatu. Blokirajući procenat ispitujućeg uzorka i pozitivne kontrole određuje se po sledećoj formuli:

$$\text{Blokiraj \%} = \frac{\text{optička gustina negativne kontrole} - \text{optička gustina uzorka}}{\text{optička gustina negativne kontrole}} \times 100$$

### **Validacija testa**

Srednja vrednost optičke gustine negativne kontrole mora biti veća od 0.5 a blokirajući procenat pozitivne kontrole mora biti  $> 50\%$ .

### **Interpretacija rezultata**

Ispitujući uzorak je pozitivan (ustanovljeno je prisustvo antitela protiv virusa KKS) ukoliko je blokirajući procenat  $\geq 40\%$ . Uzorak je negativan (nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS) ukoliko je blokirajući procenat  $\leq 30\%$ . Ukoliko je blokirajući procenat između 30 i 40 %, potrebno je ponovno ispitati životinju nakon određenog vremena.

### **4.2.3. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVD) – virus neutralizacioni test**

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa BVD korišćen je virusneutralizacioni (VN) test. Za izvođenje testa primenjen je NADL soj virusa BVD. Virusneutralizacioni test je izvođen po standardnoj proceduri opisanoj u "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines", Office International Des Epizooties (1996) i „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals", Office International Des Epizooties (2004) u mikrotitracionim pločama sa 96 bazenčića sa ravnim dnom, uz korišćenje manjih modifikacija.

Uzorci krvnih seruma su inaktivisani na temperaturi od 56 °C u trajanju od 30 minuta. Na ovaj način obrađeni serumi su titrirani u dvostrukim serijskim razređenjima počevši od razređenja 1:2 pa sve do razređenja 1:512, za razliku od opisane metode u "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (1996) i „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals", Office International Des

Epizooties (2004) u kojoj je prvo razređenje seruma 1:5. Za razređenja seruma je korišćena podloga za rast kultura ćelija (Eagle MEM). Svaki serum je titriran u samo jednom primerku. Na svako razređenje ispitujućih seruma je u jednakoj količini (50 µL) dodato 100 TCID<sub>50</sub> NADL soja virusa BVD. Na svakoj mikrotitracionoj ploči su postavljene, u po 4 udubljenja sa ravnim dnom, pozitivne kontrole virusa (virus i ćelije), negativna kontrola ćelija (same ćelije) i kontrola pozitivnog seruma (pozitivan serum, virus i ćelije). Serumi su sa virusom inkubirani tokom 1 sata na 37 °C. Nakon isteka ovog perioda na mešavinu virusa i seruma, odnosno u svaki bazenčić na mikrotitracionoj ploči su dodavane MDBK ćelije (Madin-Darby Bovine Kidney cells) u suspenziji od  $3 \times 10^5$  u 1 ml i u količini od 100 µL. Nakon ovih postupaka mikrotitraciona ploča sa uzorcima je inkubirana na 37 °C u toku 4 dana. Nakon isteka ovog perioda vršeno je očitavanje rezultata (ukoliko su sve kontrole ispravne). Reakcije su očitavane na taj način što se kao titar VN antitela uzimala recipročna vrednost krajnjeg razređenje ispitivanog seruma koje je u potpunosti neutralisalo aktivnost virusa BVD.

#### **4.2.4. Pregled krvi i organa eksperimentalnih životinja na prisustvo antigena virusa klasične kuge svinja**

Imunoenzimski test za ustanovljavanje antigena virusa klasične kuge svinja

(Komercijalni ELISA set kit: Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit, HerdChek\* CSFV Ag, proizvođača: IDEXX Laboratories, USA)

Imunoenzimski (ELISA) test je namenjen otkrivanju antigena virusa KKS u leukocitima periferne krvi (PBL), nezgrušanoj krvi, ćeliskoj kulturi i uzorcima tkiva. Ovo je "sendvič" ELISA test u kome su mikrotitracione ploče prekrivene poliklonskim serumom koji vezuje antigene virusa KKS. Monoklonska antitela koja se dodaju u sledećoj fazi, formiraju vrh sendviča. Vezu između antigena iz uzorka i monoklonskih antitela detektuje Horseradish-Peroksidaza konjugat. Ovaj enzim vrši konverziju dodatog supstrata, a optička gustina (OD) se meri čitačem spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm ili dvostruko na 450 nm i 620 nm.

**Test obuhvata sledeće komponente:**

1. Mikrotitraciona ploča čiji su bazenčići pokriveni kozijim poliklonskim antiserumom sa antitelima protiv virusa KKS;
2. 55 ml razređivača za uzorak, 10x koncentrovan;
3. 125 ml rastvora za ispiranje, 10x koncentrovan;
4. 4 ml specifičnih monoklonskih antitela za virus KKS (CSFV mAb), koja sadrže i zaštitno sredstvo;
5. 1.5 ml pozitivne kontrole;
6. 1.5 ml negativne kontrole;
7. 200 µL anti-mišji IgG, konjugovani peroksidazom (HRPO), 100x koncentrovan;
8. 15 ml rastvarača za konjugat;
9. 12 ml supstrat rastvora (TmB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i
10. 12 ml STOP rastvora (1M HCl).
11. Rezultati su analizovani uz pomoć: „Global Animal Health Monitoring Software, xCheck™ Software, IDEXX Production animal services“.

#### **Priprema reagenasa:**

1. Koncentrovan (10x) rastvor za ispiranje treba ostaviti na sobnoj temperaturi i blago protresti. Koncentrovan rastvor se razređuje redistilovanom vodom u odnosu 1:10. Rekonstituisan rastvor se može uskladištiti nedelju dana na temperaturi 2 – 8 °C.
2. Razređivač za uzorke se razređuje pre upotrebe redistilovanom vodom, u odnosu 1:5 (za uzorke nezgrušane krvi) i 1:10 (za uzorke organa). Rekonstituisan razređivač se može uskladištiti na temperaturi 2-8 °C, ali ne duže od 3 dana.
3. Koncentrovani (100x) HRPO konjugat se razređuje u odnosu 1:100 sa razređivačem konjugata i dobro se izmeša vorteksom. Ovaj rastvor je stabilan samo 24 sata.

#### **Priprema uzoraka:**

Pripremljeni uzorci krvi ili tkiva se mogu uskladištiti na temperaturi 2-8 °C do 7 dana, ili zamrznuti na -20 °C ne gubeći na kvalitetu najmanje 6 meseci.

Uskladištene uzorke treba neposredno pre upotrebe recentrifugirati na 1,500 xg u toku 10 minuta ili 10,000 xg u toku 2-5 minuta.

#### **1. Krv sa antikoagulansom (Heparin ili etilendiamotetrasirćetna kiselina, EDTA):**

Direktno u udubljenja mikrotitracione ploče se dodaje 75 µL krvi i 10 µL 5x koncentrovanog razređivača za uzorak. Sadržaj u udubljenjima se meša blagim protresanjem cele ploče.

## **2. Obrada tkiva:**

- sa makazama se 1-2 grama tkiva isecka u tarioniku na komadiće veličine 2-5 mm.
- komadići tkiva se stave u epruvetu za centrifugiranje od 10 ml i doda se 5 ml razređivača za uzorak razređen 1:10. Nakon toga, uzorak se blago meša vorteksom. Inkubira se 1-2 sata na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje vorteksom.
- nakon toga se centrifugira na 1,500 xg u toku 10 minuta i za test se uzima 75 µL čistog supernatanta.

Istovetni postupak obrade tkiva je primenjen i tehniku RT-PCR.

### **Test procedura:**

Pre upotrebe svi reagensi se drže na sobnoj temperaturi (18-25 °C). Reagensi se blago izmešaju protresanjem ili pomoću vorteksa.

1. U svako udubljenje mikrotitracione ploče unosi se 25 µL specifičnih monoklonskih antitela protiv virusa KKS (CSFV Specific mAb).
2. U odgovarajuća udubljenja, prema šemi izvođenja testa, unosi se 75 µL pozitivne i negativne kontrole u duplikatu. Ne koristi se isti nastavak pipete za različite kontrole.
3. U odgovarajuća udubljenja se dodaje 75 µL prethodno pripremljenog materijala za ispitivanje, pri čemu se preporučuje rad u duplikatu. Ne koristi se isti nastavak pipete za različite uzorke. Ploča se lagano protrese da bi se obezbedilo ravnomerno mešanje svih sastojaka u udubljenjima.
4. Mikrotitraciona ploča se inkubira preko noći na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u vlažnoj komori. Alternativno, može se inkubirati na sobnoj temperaturi tokom 4 sata u vlažnoj komori, ali ovim postupkom opada osetljivost testa.
5. Posle završene inkubacije, udubljenja se prazne i ispiraju pet puta sa rastvorom za ispiranje. Svako udubljenje se puni sa 300 µL ovog rastvora. Nakon ispiranja, ostatak tečnosti se otresa na papirnu vatu.
6. U svako udubljenje mikrotitracione ploče unosi se 100 µL HRPO-konjugata i inkubira se jedan sat u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi (18-25 °C).
7. Nakon jednog sata se ponavlja pranje ploče, kao što je opisano pod tačkom 5.
8. U svako udubljenje mikrotitracione ploče unosi se 100 µL rastvora supstrata i inkubira se 10 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Vreme počinje da se meri od momenta punjenja prvog bazenčića.

9. Reakcija se zaustavlja nakon 10 minuta dodavanjem 100  $\mu$ L STOP rastvora u svaki bazenčić. STOP rastvor se uvek dodaje istim redosledom kao i supstrat.
10. Očitavanje reakcije uzoraka i kontrola se vrši spektrofotometrom na 450 nm ili dvostruko na 450 i 620 nm.

#### **Izračunavanje srednje vrednosti optičke gustine (OD)**

Prvo se izračunava srednja vrednost optičke gustine (OD) za negativnu ( $NCx^-$ ) i pozitivnu kontrolu ( $PCx^-$ ):

$$NCx^- = NC1 A_{450} + NC2 A_{450} / 2$$

$$PCx^- = PC1 A_{450} + PC2 A_{450} / 2$$

Na kraju se izračunava korigovana vrednost za ispitivani uzorak:

$$S - N = \text{Uzorak } A_{450} - NCx^- A_{450}$$

Primenom postojećeg sistema softvera dobijaju se izračunati rezultati.

#### **Validacija testa**

U cilju validacije testa, pozitivna kontrola treba da ima OD vrednost veću od 0.500. Negativna kontrola treba da ima OD vrednost za 20% manju u poređenju sa OD vrednosti pozitivne kontrole. Ukoliko nisu dobijene navedene vrednosti, test treba da se ponovi. Ukoliko negativna kontrola konstantno daje visoku vrednost OD, treba izvršiti centrifugiranje kontrolnog materijala (10,000 xg, 3-5 minuta) i ponoviti testiranje.

#### **Interpretacija rezultata:**

Uzorak je pozitivan (ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS) ako je njegova korigovana OD vrednost  $\geq 0.300$ . Sumnja na prisustvo antigena postoji ako je korigovana OD uzorka  $\geq 0.200$  i  $< 0.300$ . Uzorak je negativan ako je njegova korigovana OD vrednost  $\leq 0.200$ .

#### **4.2.5. Pregled krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo antitela protiv proteina $E^{ms}$ virusa klasične kuge svinja**

Imunoenzimski marker test za ustanovljavanje antitela protiv glikoproteina  $E^{ms}$  virusa klasične kuge svinja (Komerčijalni ELISA set kit: Classical Swine Fever Marker Antibody test Kit, Chekit\* CSF Marker, proizvođača: IDEXX Laboratories, USA)

#### **Princip testa**

Imunoenzimskim (ELISA) testom se utvrđuje prisustvo antitela protiv glikoproteina  $E^{ms}$ (E0) pestivirusa (virus KKS, BVDV, BDV) u serumu ili plazmi.



Primenom Marker ELISA testa omogućena je diferencijacija svinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom ( $E^{rns}$  negativan nalaz) od jedinki inficiranih virusom KKS ( $E^{rns}$  pozitivan nalaz).

Test se izvodi u mikrotitracionim pločama koje su prekrivene sa monoklonskim anti- $E^{rns}$  antitelima. Ispitujući uzorci se inkubiraju u bazenčićima mikrotitracionih ploča zajedno sa definisanom količinom  $E^{rns}$ . Ukoliko su u ispitujućem uzorku prisutna antitela protiv  $E^{rns}$ , ona vezuju  $E^{rns}$  antigen u rastvoru i formira se antigen/antitelo kompleks koji se neće vezati za antitela kojima je obložena površina mikrotitracione ploče (pozitivan nalaz). Na vezivanje  $E^{rns}$  za ploču nemaju uticaj uzorci poreklom od svinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom.

Materijal se uklanja iz bazenčića mikrotitracione ploče ispiranjem. Nakon toga se dodaje peroksidazom obeležen anti- $E^{rns}$  konjugat, koji se vezuje za kompleks  $E^{rns}$  antigen/antitelo na površini bazenčića mikrotitracione ploče. Nevezani konjugat se odstranjuje ispiranjem, i u bazenčiće se dodaje supstrat koji sadrži hromogen. Step en obojenosti koji se razvija (optička gustina na 405, referentna talasna dužina  $\lambda=492$  nm) je obrnuto proporcionalan sa količinom specifičnih  $E^{rns}$  antitela u ispitujućem uzorku. Vrednost optičke gustine (OD) uzorka se poredi sa OD vrednosti u bazenčićima pozitivne kontrole.

**Test obuhvata sledeće komponente:**

1. Chekit-CSF-Marker mikrotitraciona ploča, čiji su bazenčići pokriveni sa anti-  $E^{rns}$ -antitelima (2x5ploča)
2. Chekit-Anti-  $E^{rns}$ -PO konjugat, obeležen sa ren (horsrediš) peroksidazom (2x1.0 ml)
3. Chekit-CSF-Marker pozitivni kontrolni serum (2x 2.0 ml)
4. Chekit-CSF-Marker negativni kontrolni serum (2x2.0 ml)
5. Chekit-CSF-Marker-Aditiv-A (90 ml)
6. Chekit-CSF-Marker-Aditiv-B (90 ml)
7. Chekit-CSF-  $E^{rns}$ , rekombinantni  $E^{rns}$  proizveden u ćelijskoj kulturi (2x15 ml)
8. Chekit rastvor za ispiranje, 10x koncentrovan (3x100ml)
9. Chekit-Chromogen (2x100 ml)
10. Chekit Stop rastvor (60 ml)
11. Rezultati su analizovani uz pomoć: „Global Animal Health Monitoring Software, xCheck™ Software, IDEXX Production animal services“.

**Priprema reagenasa:**

1. Chekit-Rastvor za ispiranje je koncentrovan, tako da se prvo vrši njegovo razređivanje sa redestilovanom vodom u odnosu 1:10. Rekonstituisan rastvor se može uskladištiti na temperaturi između 2-8 °C u toku 7 dana.
2. Priprema razređivača za uzorke: rastvara se 4 dela Chekit-CSF-Marker-Aditiv –A sa 6 delova Chekit-CSF-Marker-Aditiv-B (za jednu mikrotitracionu ploču potrebno je 5.2 ml aditiva-A + 7.8 ml aditiva-B). Rastvor se za rad priprema kao svež i stabilan je 24 sata.
3. Priprema razređivača za konjugat: rastvara se Chekit-CSF-Marker Aditiv-A i Chekit-rastvor za ispiranja u odnosu 1:9 (za jednu mikrotitracionu ploču 2.1 ml aditiva + 18.9 ml rastvora). Rastvarač se priprema kao svež i stabilan je 24 sata.

**Test procedura:**

Pre upotrebe, svi reagensi se drže na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u trajanju od najmanje jedan sat.

1. U svako udubljenje mikrotitracione ploče se unese 125 µL razređivača za uzorak.
2. U odgovarajuća udubljenja mikrotitracione ploče, unosi se 50 µL pozitivne i negativne kontrole.
3. U preostala udubljenja se dodaju ispitujući uzorci, pri čemu se za svaki ispitujući uzorak koristi drugi nastavak pipete.
4. Ploča se lagano protrese u cilju ravnomernog mešanja sastojaka u udubljenjima.
5. U svako udubljenje mikrotitracione ploče se unosi 25 µL Chekit-CSF- E<sup>ms</sup>.
6. Ploča se lagano protrese u cilju ravnomernog mešanja sastojaka u udubljenjima.
7. Mikrotitraciona ploča se poklopi i inkubira u vlažnoj komori na temperaturi od 37 °C u vremenu od 2 sata.
8. Posle završene inkubacije, udubljenja mikrotitracione ploče se prazne i ispiraju 3 puta sa rastvorom za ispiranje (približno 300 µL), pri čemu se svako udubljenje prilikom ispiranja puni do vrha. Nakon trećeg ispiranja, ostatak tečnosti se nežno otresa na papirnu vatu. Treba izbegavati sušenje udubljenja između ispiranja i pre dodavanja sledećeg reagensa.
9. Razređivanje Chekit-CSF-Anti-E<sup>ms</sup>-PO konjugat 1:200 primenom rastvarača za konjugat (za jednu ploču 105 µL konjugata + 21 ml rastvarača)
10. Uneti 200 µL ovog rastvora u svako udubljenje, prekriti i inkubirati mikrotitracionu ploču u vlažnoj komori na temperaturi 37 °C u vremenu od 2 sata.

11. Ponavlja se pranje ploče, kako je opisano pod tačkom 8.
12. U svako udubljenje mikrotitracione ploče unosi se 200  $\mu$ L Chekit-Hromogen.
13. Supstrat se inkubira u vremenu od 30 minuta na sobnoj temperaturi (18-25 °C).
14. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 50  $\mu$ L Chekit-stop rastvora u svako udubljenje mikrotitracione ploče. Stop rastvor se dodaje po istom redosledu kao i hromogen (supstrat).
15. Očitavanje reakcije se vrši spektrofotometrom na 405 nm.
16. Nakon toga se vrši izračunavanje OD vrednosti za svaki ispitani uzorak i kontrole.

### **Izračunavanje vrednosti optičke gustine (OD)**

Razlika dobijenih vrednosti između pozitivnih i negativnih kontrola treba da je  $\geq 0,300$  i odnos (količnik) između negativne i pozitivne kontrole  $\geq 2,000$ . Kao orijentacija, OD negativne kontrole ne sme biti  $> 1,800$ . Uzorci se analiziraju određivanjem opsega do kog uzorak ili kontrola inhibira reakciju Chekit-CSF-Anti-E<sup>rns</sup>-PO konjugata.

Inhibicija pozitivne kontrole ( $IN_{pos}$ ) se izračunava oduzimanjem OD u udubljenjima sa pozitivnom kontrolom ( $OD_{pos}$ ) od OD negativne kontrole ( $OD_{neg}$ ):

$$IN_{pos} = OD_{neg} - OD_{pos}$$

Izračunavanje inhibicije ispitujućeg ( $IN_{sample}$ ) uzorka predstavlja razliku između OD negativne kontrole ( $OD_{neg}$ ) i OD uzorka ( $OD_{sample}$ ):

$$IN_{sample} = OD_{neg} - OD_{sample}$$

Analiza uzoraka u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu se vrši po formuli:

$$\text{Vrednost (\%)} = \frac{OD_{neg} - OD_{sample}}{OD_{neg} - OD_{pos}} \times 100\%$$

### **Interpretacija rezultata**

Ispitujući uzorak je pozitivan, ukoliko je blokirajući procenat  $\geq 50\%$ . Uzorak je negativan ukoliko je blokirajući procenat  $< 40\%$ . Ukoliko je blokirajući procenat  $\geq 40\%$  do  $< 50\%$ , uzorak je sumnjiv na prisustvo antitela protiv glikoproteina E<sup>rns</sup> virusa KKS.

#### **4.2.6. Reverzna transkripcija – lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)**

##### **Dokazivanje genoma virusa KKS**

Dokazivanje prisustva RNK genoma virusa KKS je vršeno RT-PCR-om. Ovaj test, kao visoko osetljiv i specifičan, korišćen je za direktno utvrđivanje prisustva virusa KKS u uzorcima briseva, nezgrušane krvi i tkiva koji su pokazali pozitivnu ili sumnjivu reakciju ELISA testom na antigen virusa KKS i kao jedna od indirektnih metoda potvrde izolacije virusa. Metodom RT-PCR je ukupno ispitano 410 uzoraka briseva, 40 uzoraka krvi i 49 uzoraka organa i tkiva. Utvrđivanje nukleinske kiseline genoma virusa KKS obuhvata: izolaciju-ekstrakciju RNK iz uzoraka, zatim RT-PCR upotrebom komercijalnog kita „Access RT-PCR System“, proizvođača „Promega Corporation“ i detekcija PCR produkata na agaroznom gelu.

##### **Ekstrakcija - izolacija RNK**

Prvi korak radi utvrđivanja prisustva genoma virusa KKS predstavlja ekstrakcija ukupne RNK, odgovarajućeg kvaliteta i količine, iz ispitujućeg uzorka. Postupak ekstrakcije je vršen u PCR čistim (DNKaza i RNKaza slobodnim) mikrotubama („ependorf“) od 1,5 ml upotrebom Trizol<sup>®</sup> reagenta po uputstvu proizvođača ("Invitrogen life technologies"). TRIzol<sup>®</sup> Reagent predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin izotiocijanata koji je podesan za izolaciju RNK različitih vrsta (informaciona, transportna i ribozomalna) kao i molekularnih težina. Tokom postupka homogenizacije ili lize uzorka, TRIzol<sup>®</sup> Reagent održava integritet RNK u toku razaranja i razgradnje ćelijskih komponenata. Dodavanjem hloroforma i naknadnim centrifugiranjem dolazi do razdvajanja vodene i organske faze u uzorku. Estrahovana RNK ostaje isključivo u vodenoj fazi uzorka. Nakon odvajanja vodene faze i dodavanja izopropil alkohola, vrši se precipitacija izolovane RNK koja se koncentriše centrifugiranjem. Izopropil alkohol se odbacuje, a peletnatant RNK na dnu ependorf epruvete se, radi daljeg prečišćavanja, ispira sa 75% ledenim (-20 °C) etanolom. Nakon centrifugiranja i kratkotrajnog sušenja precipitat RNK se otapa dodavanjem PCR čistom (RNKaza slobodnom) vodom. Precipitat RNK se ne sme potpuno osušiti jer se na taj način smanjuje njegova rastvorljivost u vodi. Količina

estrahovane RNK uzorka se određuje spektrofotometrijski. Resuspendovana RNK se koristi odmah u RT-PCR reakciji ili se čuva na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Postupak ispitivanja**

Ukratko, na 250  $\mu\text{L}$  uzorka je dodavano 750  $\mu\text{L}$  Trizol<sup>®</sup> reagenta, pažljivo promešano i inkubirano na sobnoj temperaturi 5-10 minuta. Nakon isteka inkubacije, na mešavinu je dodavano 200  $\mu\text{L}$  hloroforma i dobro izmešano. Dobijena mešavina je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta nakon čega je centrifugirana na 14,000 rpm tokom 15 minuta na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Jasno izdvojena gornja vodena faza uzorka (oko 500  $\mu\text{L}$ ), koja sadrži estrahovanu RNK, pažljivo je odpipetirana u novu mikrotubu i na nju je dodavano 500  $\mu\text{L}$  izopropanola. Ova mešavina je inkubirana na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega je centrifugirana (radi taloženja RNK) na 14,000 rpm 10 minuta na  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja na dnu mikrotuba se nalazi talog estrahovane RNK, koji se često ne vidi golim okom. Celokupni sadržaj iznad taloga se pažljivo odbacuje i na njega dodaje 500  $\mu\text{L}$  75% etanola ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Talog je nastavkom mikropipete pažljivo resuspendovan u etanolu i nakon mešanja centrifugiran na 10,000 rpm 5 minuta na  $4^{\circ}\text{C}$ . Dobijeni talog (estrahovana i prečišćena RNK), nakon odbacivanja supernatanta i sušenja na sobnoj temperaturi, je resuspendovan u 40  $\mu\text{L}$  PCR čiste vode (bez RNK, DNK, enzima RNaza i DNaza). Ovako pripremljena RNK je, u što kraćem vremenu, smrzavana na  $-70^{\circ}\text{C}$  do upotrebe u RT-PCR-u. Rezultati izolacije RNK se procenjuju na osnovu RT-PCR reakcije koja se sprovodi sa izolovanim - estrahovanim RNK uzorcima. Osim izolovane RNK uzoraka za ispitivanje, u RT-PCR reakciju se obavezno uključuje uzorak izolacije RNK iz pozitivne i negativne kontrole koja je dobijena u istom postupku sa uzorcima za ispitivanje. Ukoliko se pri detekciji RT-PCR produkata na gelu kod pozitivne kontrole utvrdi specifičan fragment, a kod negativne kontrole ne utvrdi specifičan fragment, može se smatrati da je iz uzoraka za ispitivanje izolovana RNK.

### **Reverzna transkripcija - lančana reakcija polimeraze**

U radu je primenjen metod reverzne transkripcije (RT), odnosno konverzije RNK u jednolančanu cDNK i lančana reakcija polimeraze (PCR) koja se odvijala u jednoj istoj tubi i u jednom, neprekinutom ciklusu. Ovaj metod nosi naziv „one-tube“ ili

„one-step RT-PCR“. Reakcije su izvedene upotrebom komercijalnog kita "Access RT-PCR system", Promega, U.K, po uputstvu proizvođača. Pripremu PCR mešavine (mešavina reagenasa neophodnih za reakciju) vršena je na ledu u posebnoj prostoriji za tu namenu i u mikrotubama od 0,2 ml. PCR mešavina za svaki uzorak se sastojala od 10 µL 5 x AMV/ *Tfl* pufera, 1 µL 10 mM dNTP, 0,250 µL prajmera A-U i D-L (100 pmol/ µL), 2 µL 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 µL enzima AMV Reverse Transcriptase (5U/ µL), 1 µL enzima *Tfl* DNK polymerase (5U/ µL) i 28,5 µL PCR čiste vode. Ovako pripremljenoj mešavini je, (u prostoriji za ekstrakciju RNK), dodana estrahovana RNK ispitujućih uzoraka u količini od po 6 µL. Ukupna zapremina PCR mešavine je iznosila 50 µL. Ovako pripremljene PCR mešavine u mikrotubama su prenete u termocikler u kojem je u istim tubama u istoj, neprekinutoj reakciji protekla i reverzna transkripcija RNK u cDNK i PCR reakcija prajmerom dirigovanog umnožavanja specifičnog fragmenta genoma virusa. Temperaturni ciklus je bio sledeći: reverzna transkripcija 45 minuta na 48 °C, denaturacija cDNK 2 minuta na 94 °C, nakon čega je sledilo 40 puta ponovljenih ciklusa denaturacije 30 sekundi na 94 °C, vezivanja prajmera 1 minut na 60 °C i sinteza komplementarnih lanaca 2 minuta na 68 °C, nakon čega je sledilo konačno podešavanje i izduživanje lanaca DNK 7 minuta na 68 °C i hlađenje na 4 °C do detekcije dobijenog PCR produkta na gelu. Upotrebljeni prajmeri u reakciji su specifično umnožavali fragment 5'NCR dela genoma veličine 298 baznih parova (bp).

### **Oligonukleotidni primeri**

Primeri A-U i D-L, proizvođača „LKB“, Austrija su korišćeni u RT-PCR reakciji za umnožavanje 5'NCR dela genoma izolata virusa KKS pri njihovoj detekciji ili potvrđi.

Redosled nukleotidnih baza je sledeći:

Prajmer            Sekvenca (5' - 3')

---

A-U            5'- ATA TAT GCT CAA GGG CGA GT- 3'

D-L    5'- ACA GCA GTA GTA TCC ATT TCT TTA - 3'

---

## **Dokazivanje PCR - produkata**

Dokazivanje PCR produkata je vršeno elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Za pripremu gela je korišćeno 0,75g agaroze (Invitrogen Life Technologies) koja je dodata u 50 ml TEA pufera (tris-acetat-EDTA, proizvođača Promega). Agarozu je potpuno otopljena u mikrotalasnoj pećnici, ohlađena na oko 60 °C i prelivena u kadicu za pripremu gela elektroforeze (Hofer HE 33 mini submarine, Amersham Biosciences). Odmah nakon sipanja, u gel postavljen je „češalj“ koji obezbeđuje formiranje bazenčića u gelu. Ovako pripremljen gel, nakon potpunog očvršćavanja je prenet u kadicu prethodno pomenute elektroforeze u koju je pre toga sipan TAE pufer u količini da prekrije postavljeni gel. Nakon toga je izvučen češalj iz gela i u formirane bazenčice naneto po 10 µL prethodno pripremljenog PCR produkta. PCR produkti su pripremljeni tako što je u mikrotitar ploču od 96 „U“ bazenčića naneto 1 µL Gel Loading solucije (SIGMA) u onoliko broj bazenčića koji odgovara broju ispitujućih PCR produkata uvećanih za 1 (za marker - DNK Ladder 100bp, Invitrogen Life Technologies, Velika Britanija). Na "loading" soluciju je zatim dodano po 10 µL PCR produkata, a markera u količini od 3 µL i pažljivo, po unapred određenom redosledu, prebačeno u bazenčice u gelu. Potom je uključena elektroforeza (100V, 30 minuta). Posle toga, gel je izvađen i prenet na transluminator (Vilber Lourmat, France) koji je pomoću UV svetla omogućavao vizualizaciju produkata DNK na gelu. Da bi UV svetlost mogla osvetliti DNK, naophodno je prisustvo etidijum bromida (Ethidium Bromide, SIGMA, USA) koji je u ovu svrhu dodan na samom početku u TAE pufer, te je bio prisutan i u gelu i u puferu elektroforeze. Pozitivni rezultat se procenjuje pojavom PCR trake-proteina, veličine oko 300 bp (298bp), u odnosu na 100bp marker koji je učestvovao u elektroforezi.

## **5. REZULTATI**

---

### **5.1. Rezultati pregleda krvnih seruma prasadi na prisustvo specifičnih (kolostralnih) antitela protiv virusa KKS**

Imunoenzimskom tehnikom (ELISA test) pregledano je ukupno 100 uzoraka krvnih seruma prasadi uzrasta 43 dana, poreklom sa farme svinja koja vrši kontinuiranu imunoprofilaksu priplodnih jedinki odnosno vakcinacija krmača K-sojem virusa KKS se obavlja 10-15 dana pre svakog zalučenja. Pregledom krvnih seruma prasadi specifična antitela protiv virusa KKS su utvrđena u ukupno 44 uzorka, u 35 ispitanih nije utvrđeno prisustvo i u 21 uzorku krvnih seruma specifična antitela protiv virusa KKS su utvrđena na granici detektabilnosti (sumnjiv nalaz na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS).

Na osnovu rezultata seroloških ispitivanja, formirane su tri eksperimentalne grupe prasadi. Prva grupa je obuhvatala prasadi kod kojih je utvrđeno prisustvo specifičnih (kolostralnih) antitela (pozitivna grupa), druga grupa je obuhvatala prasadi kod kojih nije ustanovljeno prisustvo istih (negativna grupa) i treća grupa je obuhvatala jedinke kod kojih su specifična antitela utvrđena na granici detektabilnosti odnosno sumnjiv nalaz na prisustvo kolostralnih antitela (sumnjiva grupa).

### **5.2. Rezultati pregleda krvnih seruma eksperimentalnih životinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVDV)**

Virusneutralizacionim (VN) testom 7 dana pre veštačke infekcije nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa BVD ni u jednom ispitanom uzorku krvnog seruma poreklom od svih eksperimentalnih životinja (60 uzoraka).



### **5.3. Rezultati ispitivanja serološkog statusa eksperimentalne prasadi nakon vakcinacije i veštačke infekcije: dinamika perzistencije specifičnih antitela protiv virusa KKS**

#### **Prva faza eksperimentalnog ispitivanja sa vakcinom koja sadrži K-soj virusa KKS**

Nakon formiranja tri ogleadne grupe, izvršena je vakcinacija prasadi atenuisanom vakcinom (K-soj virusa KKS, uzrast 45 dana) i 14 dpv veštačka infekcija (uzrast 59 dana). Nakon toga, svim eksperimentalnim grupama su dodana po dva neimuna praseta. Krvni serumi su pregledani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u dvodnevnom intervalima 0-28 dpi. Dinamika perzistencije specifičnih antitela protiv virusa KKS ogleadnih grupa prasadi iz prve faze ispitivanja primenom K-soja virusa KKS je prikazana u tabeli br.1.

**a) I - pozitivna – K grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih je utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (br. 1-7) neposredno pre veštačke infekcije (0 dpi), specifična antitela su utvrđena kod 3 jedinke (br. 1, 6, 7) dok je kod preostala 4 praseta ustanovljeno prisustvo istih na granici detektabilnosti (sumnjiv nalaz). Pregledom krvnih seruma 2, 4, 6 i 8 dpi u najvećem broju ispitanih uzoraka nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Izuzetak su prasad br. 5 i 6 (sumnjiv nalaz 6 dpi) i prasad br. 3 i 7 (8 dpi). U daljem toku ispitivanja (10-28 dpi) u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma prasadi utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Pregledom krvnih seruma dva nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S1 i S2), u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**b) II – negativna - K grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih nije utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (br. 8-14) 0 dpi, specifična antitela su utvrđena samo kod 1 jedinke (br. 13) dok je kod preostalih utvrđen sumnjiv (br. 8, 9, 11, 12, 14) i negativan nalaz (br. 10). Nakon toga, 2 i 4 dpi kod svih jedinki (izuzev prase

br. 13, 4 dpi) je utvrđen negativan nalaz. U daljem toku od 6 dpi rezultati ispitivanja u okviru eksperimentalne grupe su dosta ujednačeni i karakteriše ih pozitivan ili sumnjiv nalaz. Kontrolom 8-28 dpi u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma prasadi utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Pregledom krvnih seruma dva nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S3 i S4), u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**c) III - sumnjiva - K grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih je ustanovljeno prisustvo kolostralnih antitela na granici detektabilnosti i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (oznake br. 15-21) 0 dpi, kod 4 ispitane jedinke (br. 16, 18, 19, 21) nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS dok je kod preostala 3 praseta (br. 15, 17, 20) utvrđeno prisustvo istih na granici detektabilnosti (sumnjiv nalaz). Nakon toga, 2 i 4 dpi kod većine prasadi je ustanovljen negativan nalaz (izuzetak je prase br. 20, 4 dpi sumnjiv nalaz). Od 6-10 dpi kod najvećeg broja prasadi je utvrđen pozitivan nalaz dok je kod 2 praseta (br. 16, 17) utvrđen sumnjiv i kod jedne jedinke (br. 16-16 dpi) negativan rezultat na prisustvo specifičnih antitela. U daljem toku ispitivanja (18-28 dpi) u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma prasadi utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Pregledom krvnih seruma 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S5 i S6), u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**Tabela br. 1.** Rezultati pregleda uzoraka krvnih seruma eksperimentalnih životinja vakcinisanih K-sojem virusa KKS na prisustvo specifičnih antitela ELISA testom

Grupa	Dani posle infekcije																
	Br.	*	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
I-poz-K	1	+	+	+	-	-	†										
	2	+	±	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	±	-	-	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
	4	+	±	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	±	-	-	±	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+
	6	+	+	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†				
	S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†					
II-neg-K	8	-	±	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	9	-	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	11	-	±	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	12	-	±	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	13	-	+	-	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
	14	-	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
III-sum-K	15	±	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	16	±	-	-	-	-	±	±	+	+	-	+	+	+	+	+	
	17	±	±	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	19	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	20	±	±	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†					
	S6	-	-	-	-	-	-	-	-	†							

\* - serološki nalaz 43. dana života prasadi; Br. – oznake eksperimentalnih životinja; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz; (+) pozitivan nalaz na prisustvo specifičnih antitela; (†) – uginuće eksperimentalne životinje

#### Druga faza eksperimentalnog ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine

Nakon formiranja 3 ogleadne grupe od po 7 prasadi, 45. dana života obavljena je vakcinacija eksperimentalne prasadi i revakcinacija 4 nedelje (uzrast 73. dana) kasnije, subjediničnom vakcinom. Veštačka infekcija je izvršena 14 dpv<sub>2</sub> (uzrast 87 dana).

Nakon toga svim eksperimentalnim grupama su dodata po dva neimuna praseta poreklom od nevakcinisanih krmača. Krvni serumi su pregledani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u dvodnevnom intervalima 0-28 dpi. Dinamika perzistencije specifičnih antitela protiv virusa KKS oglednih grupa prasadi iz druge faze ispitivanja primenom subjedinične vakcine je prikazana u tabeli br. 2.

**a) I - pozitivna - E2 grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih je utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (br. 22-28) 0 dpi, specifična antitela protiv virusa KKS su utvrđena u svim ispitivanim uzorcima krvnih seruma. U daljem toku ispitivanja, 2-28 dpi u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela. Izuzetak je prase br. 27, kod koga su serološka ispitivanja izvršena samo još 2 i 4 dpi (pozitivan nalaz), jer je 6 dpi uginulo. Pregledom krvnih seruma 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S7 i S8), u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**b) II - negativna – E2 grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih nije utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (br. 29-35) 0 dpi, specifična antitela protiv virusa KKS su utvrđena u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma. U daljem toku ispitivanja, 2-28 dpi kod svih ispitanih prasadi utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela. Pregledom krvnih seruma 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S9 i S10), u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**c) III - sumnjiva – E2 grupa** (7 vakcinisane prasadi kod kojih je utvrđeno prisustvo kolostralnih antitela na granici detektabilnosti i 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača)

Pregledom krvnih seruma 7 prasadi (br. 36-42) 0 dpi, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS je utvrđeno u svim ispitanim uzorcima krvnih seruma. U daljem toku eksperimentalnog ispitivanja, 2-28 dpi kod svih ispitanih prasadi je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela. Izuzetak je prase br. 36 koje je uginulo 20 dpi, za koje se pozitivni serološki nalazi odnose na period 0-18 dpi. Pregledom krvnih

seruma 2 nevakcinisana praseta poreklom od nevakcinisanih krmača (br. S11 i S12), u ispitivanom periodu, nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

**Tabela br 2.** Rezultati pregleda uzoraka krvnih seruma eksperimentalnih životinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom na prisustvo specifičnih antitela ELISA testom

Grupa	Dani posle infekcije																
	br	*	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
I-poz-E2	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	27	+	+	+	+	†											
	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-neg-E2	29	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	31	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	32	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	33	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-E2	36	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	†				
	37	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	38	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	39	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	41	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	42	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* - serološki nalaz 43. dana života prasadi; Br.– oznake eksperimentalnih životinja; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz; (+) pozitivan nalaz na prisustvo specifičnih antitela; (†) – uginuće eksperimentalne životinje

## **Kontrolna grupa prasadi**

Krvni serumi kontrolne grupe prasadi (br. K1-K6) su prvi put pregledani prilikom odabira prasadi odnosno na početku perioda aklimatizacije (7 dana pre veštačke infekcije) kada je utvrđen negativan nalaz na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Pregledom krvnih seruma prasadi kontrolne grupe neposredno pre veštačke infekcije (0 dpi) takođe nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Nakon veštačke infekcije u ispitivanim uzorcima krvnih seruma (2, 4, 6, 8, 10, 12 dpi) nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS.

## **Rezultati pregleda krvnih seruma nevakcinisane prasadi poreklom od nevakcinisanih krmača na prisustvo E<sup>ms</sup> antitela protiv virusa KKS**

Pregledom krvnih seruma D-ELISA testom nevakcinisane prasadi iz ogleadne grupe vakcinisane sa K-soj vakcinom (br.S1-S6) u ispitivanom periodu (0-28 dpi) samo je u okviru I-pozitivne-K grupe utvrđena sumnjiva reakcija na prisustvo E<sup>ms</sup> antitela i to 16 dpi (br. S2) i 18 dpi (br. S1) dok je kod preostale prasadi utvrđen negativan nalaz u svim ispitivanim danima.

Pregledom krvnih seruma nevakcinisane prasadi iz ogleadne grupe vakcinisane sa subjediničnom vakcinom (br. S7-S12), u ispitivanom periodu (0-28 dpi) u uzorcima krvnih seruma nije utvrđeno prisustvo E<sup>ms</sup> antitela protiv virusa KKS.

## **5.4. Rezultati pregleda krvi eksperimentalnih životinja na prisustvo antigena i genoma virusa klasične kuge svinja**

Rezultati pregleda ukupno 794 uzoraka krvi na prisustvo antigena virusa KKS (viremija) ELISA testom su prikazani u tabelama br. 3, 4 i 5 po grupama za sve eksperimentalne životinje. U okviru istih tabela prikazani su rezultati pregleda krvi na prisustvo genoma virusa RT-PCR tehnikom (ukupno pregledano 40 uzoraka krvi).

## **Prva faza eksperimentalnog ispitivanja primenom vakcine sa K-sojem virusa KKS**

### **a) I - pozitivna – K grupa**

#### **- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđeno 4 dpi (prase br. 3), dok je kod jedinke br. 4. ustanovljen sumnjiv nalaz. Međutim, kod navedenih prasadi je pregledom krvi 6 dpi utvrđen negativan nalaz, ali je sumnjiv nalaz ponovo utvrđen kod obe jedinke 8 dpi. Pozitivan odnosno sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS utvrđen je 6 dpi kod prasadi br.1 odnosno br. 7. U daljem toku ispitivanja, 11-30 dpi kod ogledne prasadi nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS u krvi.

Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom koje su prethodno pokazale pozitivan i sumnjiv rezultat primenom ELISA testa, prisustvo virusne RNK je utvrđeno u svim ispitanim uzorcima krvi (tabela br. 3).

#### **- indirektna (kontaktna) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi 8 dpi je zabeležena prvi pozitivan (br. S1) odnosno sumnjiv nalaz (br. S2) na prisustvo antigena virusa KKS. U daljem toku ispitivanja, pozitivan nalaz je utvrđen sve do 2 dana pre uginuća prasadi, kada je utvrđen sumnjiv rezultat (18 odnosno 16 dpi).

### **b) II - negativna - K grupa**

#### **- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđeno 4 dpi kod praseta br. 11 i br. 14. Sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS je utvrđen još jednom 6 dpi (prase br. 10). Do kraja eksperimentalnog ispitivanja nije utvrđeno prisustvo antigena virusa u krvi ogledne prasadi. Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom koje su prethodno pokazale pozitivan (br. 14) i sumnjiv nalaz (br. 10 i 11) (ELISA test), nije utvrđeno prisustvo virusne RNK.

**- indirektna (kontaktana) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi u grupi, pregledom uzoraka krvi od 0-28 dpi nije utvrđeno prisustvo virusa KKS (viremija).

**c) III - sumnjiva - K grupa**

**- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđeno 4 dpi (prase br. 20). Istog dana, kod jedinke br. 17 je ustanovljen sumnjiv nalaz. Pozitivan rezultat na prisustvo antigena virusa KKS je utvrđen još jednom 6 dpi (prase br. 15), dok je kod praseta br. 20 utvrđen sumnjiv nalaz. Dalje, 8 dpi utvrđen je sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS kod dva praseta (br. 19 i 20). Do kraja eksperimentalnog ispitivanja nije više utvrđena viremija u ovoj oglednoj grupi prasadi. Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom koje su prethodno pokazale pozitivan i sumnjiv rezultat (ELISA test), prisustvo virusne RNK je potvrđeno u svim ispitanim uzorcima (tabela br. 3).

**- indirektna (kontaktana) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi u grupi (br. S5 i br. S6), pregledom uzoraka krvi prisustvo virusa KKS (viremija) je potvrđeno prvi put 10 dpi (br. S6) odnosno utvrđen je sumnjiv nalaz kod praseta br. S5. Pozitivan (br. S6) odnosno sumnjiv nalaz (br. S5) je utvrđen sve do pred uginuće.



**Tabela br. 3.** Rezultati pregleda uzoraka krvi eksperimentalnih životinja vakcinisanih atenuisanom vakcinom na prisustvo antigena (ELISA test) i genoma virusa KKS (RT-PCR)

Grupa	Dani posle infekcije															
	Br.	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
I-poz-K	1	-	-	-	+⊕	†										
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	+⊕	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	±⊕	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	±	†				
	S2	-	-	-	-	±	+	+	+	±	†					
II-neg-K	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-K	15	-	-	-	+⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	+⊕	±⊕	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S5	-	-	-	-	-	±	+	+	+	±	†				
	S6	-	-	-	-	-	-	+	+	†						

Br. – oznake eksperimentalnih životinja; (-) negativan nalaz ELISA testom; (±) sumnja na prisustvo antigena virusa KKS ELISA testom; (+) pozitivan nalaz ELISA testom; (⊕) - pozitivan nalaz RT-PCR; (∅) - negativan nalaz RT-PCR; (†) - uginuće eksperimentalne životinje

## **Druga faza eksperimentalnog ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine**

### **a) I - pozitivna - E2 grupa**

#### **- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđeno 8 dpi kod praseta br. 25, dok je sumnjiv nalaz utvrđen već 4 dpi (br. 27) i 6 dpi (br. 25 i 28). U daljem toku ispitivanja, pozitivan nalaz je zabeležen samo još 10 dpi kod praseta br. 25. Kod preostalih jedinki u grupi, utvrđen je sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi i to: 8 dpi kod prasadi br. 22 i 26; 10 dpi kod prasadi br. 23, 26, 28 i 16 dpi kod br. 25. Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom koje su prethodno pokazale pozitivan i sumnjiv nalaz (ELISA test), prisustvo virusne RNK je potvrđeno 4 dpi (br. 27), zatim 6 dpi (br. 25 i 28), 8 dpi (br. 22, 25), 10 dpi (br. 23, 25) i 16 dpi (br. 25).

#### **- indirektna (kontaktna) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi u grupi (br. S7 i S8), pregledom uzoraka krvi u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS (viremija).

### **b) II - negativna – E2 grupa**

#### **- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, sumnjiv rezultat na prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđen 4 dpi (prase br. 30), zatim 6 dpi (br. 30, 32 i 35) i 10 dpi (br. 32 i 33).

Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom u danima kada je ELISA testom utvrđena sumnjiv nalaz, samo kod dve jedinke (br. 30 - 4 dpi i br. 32 - 6 dpi) je utvrđeno prisustvo virusne RNK.

**- indirektna (kontaktna) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi u grupi (br. S9 i S10), pregledom uzoraka krvi u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS (viremija).

**c) III - sumnjiva – E2 grupa**

**- direktna infekcija**

Pregledom krvi ELISA testom, sumnjiva reakcija na prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put ustanovljena 4 dpi (br. 37 i 39), zatim 6 dpi (br. 36) i 10 dpi (br. 38 i 42). Prvi pozitivan rezultat je utvrđen 10 dpi (prase br. 36 i 39). Sumnjiv nalaz je utvrđen još jednom, 16 dpi (br. 42).

Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom u navedenim danima kada je ELISA testom utvrđen sumnjiv i pozitivan nalaz, prisustvo virusne RNK je utvrđeno 4 dpi (br. 39), 6 dpi (br. 36), 10 dpi (br. 36, 39, 42) i 16 dpi (br. 42)

**- indirektna (kontaktna) infekcija**

Kod nevakcinisane prasadi u grupi (br. S11 i br. S12), pregledom uzoraka krvi u ispitivanom periodu nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS (viremija).

**Tabela 4.** Rezultati pregleda uzoraka krvi eksperimentalnih životinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom na prisustvo antigena (ELISA test) i genom virusa KKS (RT-PCR)

Grupa	Dani posle infekcije															
	Br.	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
I-poz-E2	22	-	-	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	±⊕	+⊕	+⊕	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	±∅	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	±⊕	†											
	28	-	-	-	±⊕		±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-neg-E2	29	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	±⊕	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	±⊕	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-E2	36	-	-	-	±⊕	-	+⊕	-	-	-	-	†				
	37	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	±∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	-	-	±⊕	-	-	+⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	42	-	-	-	-	-	±⊕	-	-	±⊕	-	-	-	-	-	-
	S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Br. – oznake eksperimentalnih životinja; (-) negativan nalaz ELISA testom; (±) sumnja na prisustvo antigena virusa KKS ELISA testom; (+) pozitivan nalaz ELISA testom; (⊕) - pozitivan nalaz RT-PCR; (∅) - negativan nalaz RT-PCR; (†) - uginuće eksperimentalne životinje

### Kontrolna grupa prasadi

Pregledom krvi 6 prasadi (br. K1-K6), ELISA testom antigen virusa KKS je prvi put utvrđen već 2 dpi. U daljem toku u svim ispitivanim uzorcima (4, 6, 8, 10, 12 dpi) utvrđeno je prisustvo antigena virusa KKS u krvi (viremija) (tabela br. 5).

**Tabela 5.** Rezultati pregleda uzoraka krvi kontrolne grupe životinja na prisustvo antigena virusa KKS (ELISA test)

	Dani posle infekcije															
	br	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
<b>KONTROLNA GRUPA</b>	K1	-	+	+	+	+	+	+	†							
	K2	-	±	+	+	+	+	+	†							
	K3	-	+	+	+	+	†									
	K4	-	+	+	+	+	†									
	K5	-	±	+	+	+	+	†								
	K6	-	±	+	+	+	+	†								

(-) negativan nalaz ELISA testom; (±) sumnja na prisustvo antigena virusa KKS ELISA testom; (+) pozitivan nalaz ELISA testom; (†) - uginuće eksperimentalne životinje

### 5.5. Rezultati pregleda orofaringealnih i rektalnih briseva veštački inficirane prasadi

Kontrola izlučivanja virusa KKS iz organizma veštački inficirane prasadi je vršena uzorkovanjem orofaringealnog (ORF) i rektalnog (RE) brisa u dvodnevnom intervalima (2-10 dpi) tehnikom RT-PCR. Postignuti rezultati ispitivanja za sve eksperimentalne životinje su prikazani u tabelama br. 6 i 7.

#### Prva faza eksperimentalnog ispitivanja primenom vakcine sa K-sojem virusa KKS

##### a) I - pozitivna – K grupa

Pregledom uzoraka ORF brisa na prisustvo virusne RNK, pozitivan nalaz je ustanovljen kod najvećeg broja prasadi 4 i 6 dpi (br. 1, 3, 4, 7) i 8 dpi (br. 3, 4). Međutim, pregledom uzoraka RE brisa pozitivan nalaz je utvrđen već 2 dpi kod praseta br. 7, zatim 4 dpi (br. 1, 3, 4, 5, 6) i 6 dpi (br. 1, 5, 7).

##### b) II - negativna - K grupa

U ispitanim uzorcima ORF i RE brisa prasadi nije utvrđeno prisustvo virusne RNK.

**c) III - sumnjiva - K grupa**

Pregledom uzoraka ORF briseva prasadi pozitivan nalaz je utvrđen 4 dpi (br. 16, 20), 6 dpi (br. 19, 20) i 8 dpi (br. 19) dok je sumnjiv nalaz zabeležen 2 dpi (br. 20). Prisustvo virusne RNK je 2 dpi utvrđeno u RE brisu jedinke br. 20. U daljem toku, kontrolom RE briseva pozitivan nalaz je potvrđen 4 dpi (br. 19, 20, 21) i 6 dpi (br. 19, 20).

**Tabela 6.** Rezultati kontrole orofaringealnih (ORF) i rektalnih (RE) briseva eksperimentalnih životinja vakcinisanih K-sojem virusa KKS i veštački inficiranih, tehnikom RT-PCR

Grupa prasadi		Dani posle infekcije									
		2		4		6		8		10	
		ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE
I-poz-K	1	-	-	+	+	+	+	†			
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	4	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
II-neg-K	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-K	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	20	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	21	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(ORF) –orofaringealni bris; (RE) – rektalni bris; (+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz na prisustvo genoma virusa KKS

## **Druga faza eksperimentalnog ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine**

### **a) I - pozitivna - E2 grupa**

Pregledom uzoraka ORF brisa na prisustvo virusne RNK, pozitivan nalaz je najranije utvrđen 4 dpi (br. 27), 6 dpi (br. 25) i kod dve jedinke 8 dpi (br. 22, 23). Pregledom uzoraka RE brisa pozitivan nalaz je ustanovljen 4 dpi (br. 27), zatim 6 dpi (br. 22, 28) i 8 dpi (br. 23 i 25).

### **b) II - negativna – E2 grupa**

Pregledom uzoraka briseva prisustvo virusne RNK je utvrđeno kod dva praseta: 4 dpi u ORF brisu (prasad br. 29 i 30) i 6 dpi u RE brisu praseta br. 29 i ORF brisu jedinke br. 30.

### **c) III - sumnjiva – E2 grupa**

Pregledom uzoraka ORF brisa na prisustvo virusne RNK, pozitivan nalaz je ustanovljen 4 dpi (prase br. 39), 6 dpi (br. 36) i 8 dpi (br. 42). Kontrolom uzoraka RE briseva pozitivan nalaz je utvrđen 4 dpi (prase br. 39) i 8 dpi (br. 36)

**Tabela 7.** Rezultati kontrole orofaringealnih i rektalnih briseva eksperimentalnih životinja vakcinisanih subjediničnom vakcinom i veštački inficiranih, tehnikom RT-PCR

Grupa prasadi		Dani posle infekcije									
		2		4		6		8		10	
		ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE	ORF	RE
I-poz-E2	22	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	+	+	†					
	28	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
II-neg-E2	29	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	30	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-E2	36	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	42	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

(ORF) – orofaringealni bris; (RE) – rektalni bris; (+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz na prisustvo genoma virusa KKS

### 5. 6. Rezultati kliničkog pregleda eksperimentalne prasadi

Od dana kada je po 7 prasadi u okviru svake grupe veštački inficirano i/m aplikacijom virusa KKS, ogled je trajao 30 dana kada je izvršeno žrtvovanje preživelih jedinki. Kod svih životinja svakodnevno su beleženi klinički znaci bolesti i merena telesna temperatura. Nakon uginuća ili žrtvovanja, izvršen je patomorfološki pregled prasadi.



## **Prva faza eksperimentalnog ispitivanja primenom vakcine sa K-sojem virusa KKS**

### **a) I - pozitivna - K grupa**

#### **- direktna infekcija (prasad br. 1-7)**

Prvi porast telesne temperature iznad fizioloških vrednosti (40 °C - 40.5 °C) zabeležen je već 2 dpi (prasad br. 3, 4, 5, 6 i 7). Narednog dana (3 dpi) iako je cela grupa delovala nezainteresovano i usporeno, kod istih jedinki nije zabeležen dalji rast telesne temperature već nasuprot tome pad za 0.1-0.3 °C. Međutim, istog dana kod praseta br. 1 zabeležen je skok telesne temperature (41.2 °C) i promena opšteg stanja: apatija, inapetencija, nakostrešena dlaka, ne prilazi hranilici. Narednog dana (4 dpi), kod praseta br. 1 usledilo je dalje pogoršanje zdravstvenog stanja: febra (40.6 °C), apatija, inapetencija, izostanak reakcije na zvučne i taktilne nadražaje, profuzan proliv žućkasto-branon boje. Iako je 5 dpi zabeležen pad vredosti telesne temperature kod praseta br. 1 (39.9 °C), usledilo je dalje pogoršanje kliničkog stanja (teška apatija, anoreksija, nevoljno ustaje, ležanje, dlaka nakostrešena, abdomen i gladne jame upale, čujan vlažan kašalj, tapkanje zadnjim nogama, stajanje na mestu uz oslanjanje na zid, pri pokušaju ustajanja zauzima pseći sedeći položaj). Tragovi tečnog izmeta su bili vidljivi po celom boksu. Kod preostalih jedinki u grupi nisu zabeleženi vidljivi klinički znaci oboljenja iako je kod tri praseta (br. 3, 5, 6) 5 dpi zabeležena pireksija (40.0 - 40.2 °C), 6 dpi su izmerene fiziološke vrednosti telesne temperature. Kod jedinice br. 1 je 6 dpi zabeleženo gotovo besvesno stanje, jaka dehidracija (upali očni bulbusi, nakostrešena suva dlaka), očni kapci delimično slepljeni i sasušeni iscedak u medijalnom očnom uglu, perinealna regija uprljana izmetom, izrazito zacrvenjena i otok kože u predelu anusa. Na taktilni i zvučni podražaj prase je reagovalo veslanjem zadnjim nogama. U daljem toku dominirale su konvulzije sa iskolačenim očima, tremor mišića, subfebrilnost (37.1 °C) i uginuće (7 dpi). Kod preostale prasadi u grupi do kraja eksperimentalnog ispitivanja (30 dpi) nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

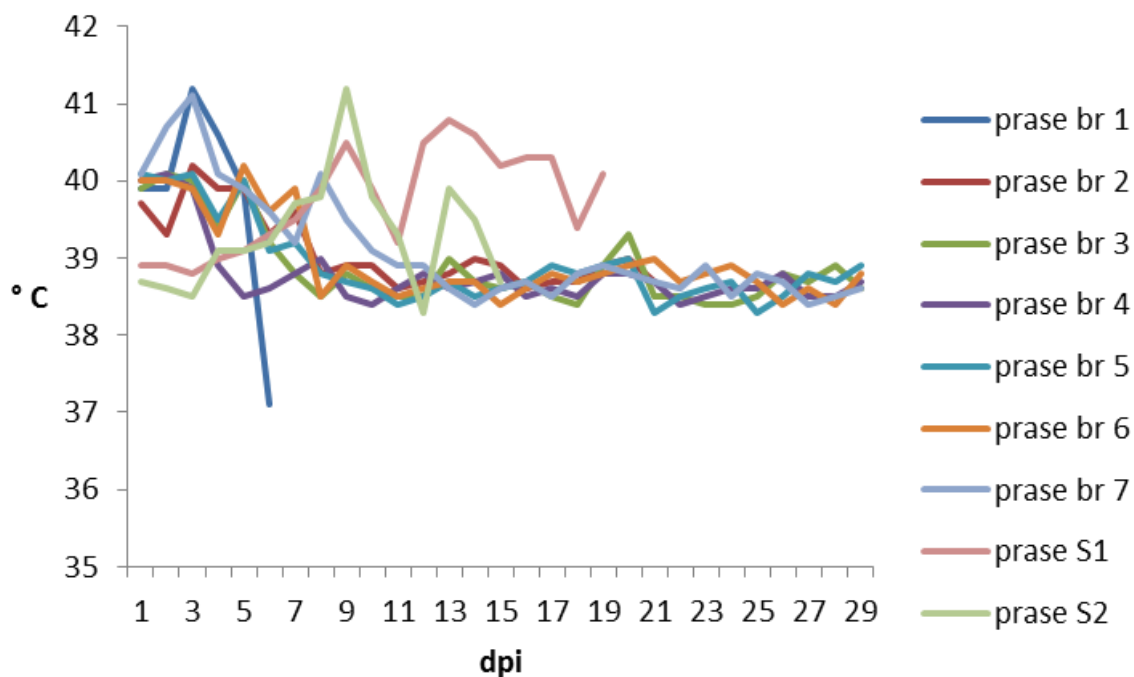
#### **- indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S1 i S2)**

Od trenutka kada je obavljena direktna infekcija u grupi, tokom prvih 7 dana kohabitacije neimune prasadi (br. S1 i S2) sa vakcinisanim i inficiranim jedinkama (br.1-7) nisu utvrđeni klinički znaci oboljenja. Prvi klinički znaci oboljenja kod prasadi br. S1 i S2 su zabeleženi 8 dpi: ležanje, povlačenje u delove boksa bez izvora svetlosti (fotofobija), apatija, anoreksija, po oboru tragovi sasušenog i tvrdog izmeta poput

brabonjaka (opstipacija), bez pireksije (39.7 °C i 39.8 °C). Narednog dana (9 dpi) usledio je skok telesne temperature (40.5 °C i 41.2 °C) sa znacima jake apatije, letargije. Kliničkim pregledom utvrđen je konjunktivitis, zažarene beonjače, izražena dispnoja, vlažan kašalj, promuklo oglašavanje (afonija) i izraženi lokomotorni poremećaji: otežano stajanje i slabost zadnjih ekstremiteta, ukočen stav zadnjih nogu, hod na vrhovima prstiju, posrtanje i padanje, pseći sedeći stav. Već 10 dpi usledio je pad vrednosti telesnih temperatura (39.9 °C i 39.8 °C) i izraženiji znaci poremećaja lokomotornog sistema kod jedinke br. S1: ležanje, pri pokušaju ustajanja vuče zadnje noge po podu, nakon ustajanja ukrštanje zadnjih nogu, hod na vrhovima papaka, padanje. Kod praseta br. S2 je bila izražena apatija, dispnoja, afonija i vlažan kašalj. Narednog dana (11 dpi) zabeležen je dalji pad vrednosti telesnih temperatura (39.2 °C i 39.3 °C) uz pogoršanje opšteg stanja, naročito kod praseta br. S2, uz izražen konjunktivitis, teška dehidracija, apatija, profuzan proliv, prase pokušava da ustane ali ne uspeva, vuče zadnji deo tela (pareza zadnjih ekstremiteta). Ponovni skok telesne temperature je zabeležen 12 dpi kod jedinke br. S1 (40.5 °C), dok je kod br. S2 zabeležen pad iste (38.3 °C). Nakon toga, 13 dpi kod jedinke br. S1 je zabeležena febra (40.8 °C) uz izraženu dispnoju dok je kod praseta br. S2 (39.9 °C) bilo čujno krkljanje, vlažan kašalj, afonija, dispnoja, profuzan proliv i znaci teške apatije, letargije. Karakteristična slika je bila da prase žvaće u prazno, prilazi pojilici, zariva glavu odnosno njušku u vodu ali se ista vraća jer ne može da guta. Kod obe jedinke 14 dpi je zabeležena pojava eritema po koži zadnjih ekstremiteta i donjih delova tela (vrat, grudi, ventralni deo adomena, perineum, perinealna regija), uz već navedene kliničke simptome od prethodnih dana i febru kod br. S1 (40.6 °C). Kod br. S2 je bila izražena pareza prednjih i zadnjih ekstremiteta (kvadripareza), uz fiziološke vrednosti telesne temperature (39.5 °C). Kod obe jedinke je 15 dpi zabeležena paraliza zadnjih ekstremiteta, škripanje zubima, iskolačene oči, dispnoja, afonija, profuzan proliv. Kod br. S1 je utvrđena febra (40.2 °C), dok je prase br. S2 pokazivalo pad vrednosti telesne temperature (38.7 °C). Krajem 16 dpi je uginulo prase br. S2, dok je kod br. S1 zabeležena febra (40.3 °C), šištanje pri disanju, gnojni iscedak iz nosa, paraliza zadnjih ekstremiteta. Sutradan (17 dpi) je usledilo dalje pogoršanje kliničke slike (40.2 °C) i 18 dpi zabeležen je pad telesne temperature (39.4 °C) i pojava krvarenja po koži (predeo vrata, karpalni i tarzalni zglobovi, ingvinalna regija, butovi, oko korena i po koži repa),

tremor, konvulzije. Narednog dana (19 dpi) promene po koži su bile izraženije, uz nalaz krvi u izmetu i 20 dpi je usledilo uginuće.

**Grafikon br. 1.** Vrednosti telesnih temperatura direktno i kontaktno inficirane prasadi iz pozitivne-I-K grupe



## b) II - negativna - K grupa

### -direktna infekcija (prasad br. 8-14)

U ovoj grupi prasadi nakon eksperimentalne infekcije u ispitivanom periodu nisu utvrđeni klinički znaci KKS. Samo je 3 dpi zabeležen skok telesne temperature kod praseta br. 11 i 14 (40 °C) bez drugih znakova KKS.

### -indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S3 i S4)

U grupi neimune prasadi (br. S3, S4) izloženih kontaktnoj infekciji u ispitivanom periodu nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

## c) III - sumnjiva - K grupa

### -direktna infekcija (prasad br. 15-21)

Već 2 dpi kod 4 direktno inficirane jedinice (br. 15, 16, 18, 20) zabeležen je porast telesne temperature (40.0 do 40.8 °C). Klinički simptomi oboljenja su utvrđeni kod praseta br. 20: apatija, ležanje pod lampom u slami, nakostrešena dlaka, drhtanje, konjunktivitis, ali pri hranjenju ustaje i prilazi hranilici, njuši hranu. Narednog dana (3 dpi) febra je utvrđena samo kod praseta br. 20 (40.8 °C) i pored već navedenih kliničkih

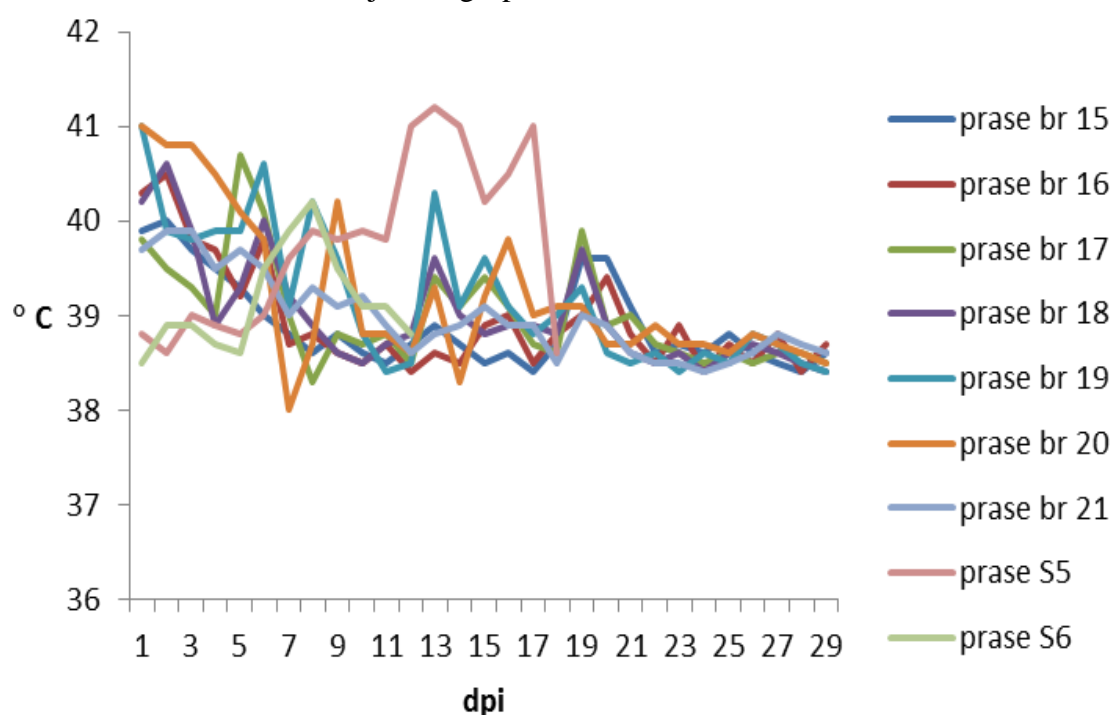
simptoma, prisutan je izražen otok i sasušen iscedak na rubovima očnih kapaka i u medijalnom očnom uglu. Pored praseta br. 20 (40.5 °C, apatija, drhtanje, ležanje na grudima, proliv), 4 i 5 dpi su utvrđeni klinički znaci oboljenja i kod praseta br. 19: otok očnih kapaka, serozan iscedak iz oka, 39.9 °C, apatija, nakostrešenost dlake. Sutradan, 6 dpi kod praseta br. 20 je zabeležen pad telesne temperature (39.8 °C) uz pogoršanje kliničke slike oboljenja (ležanje, afonija, inapetencija, apatija, stajanje na jednom mestu, otok očnih kapaka, konjunktivitis). Nešto blaža slika je utvrđena kod praseta br. 19 (40.6 °C, apatija, inapetencija, stajanje na jednom mestu, otok očnih kapaka). Blaga apatija, inapetencija i pireksija je zabeležena i kod prasadi br. 17 (40.1 °C) i br. 18 (40 °C). Međutim, 7 dpi usledilo je kliničko poboljšanje kod svih jedinki. Prase br. 20 je još uvek bilo iscrpljeno, nakostrešene dlake, uz afoniju ali je počelo da ustaje i jede (38 °C). Kod praseta br. 19 je 8 dpi je zabeležena febra (40.2 °C) uz očuvan apetit. Nakon toga, 9 dpi je usledio ponovni skok telesne temperature prasadi br. 20 (40.2 °C) sa izraženim konjunktivitisom, dok je kod jedinke br. 19 zabeležen pad iste (39.6 °C), uz već navedene simptome oboljenja. Znaci apatije, ležanje, blag otok kapaka su zabeleženi još 10 i 11 dpi (br. 19 i 20). Kod navedene prasadi (br. 17, 18, 19, 20) kao i kod preostalih jedinki u grupi do kraja eksperimentalnog ispitivanja nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

#### **-indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S5 i S6)**

Kod praseta br. S6 je 6 dpi zabeležena blaga apatija, ležanje, smanjen apetit nakon čega je 7 dpi usledila izražena inapetencija i letargija. U daljem toku, 8 dpi kod br. S6 zabeležena je febra (40.2 °C), uz pogoršanje opšteg stanja: izražena apatija, afonija, opstipacija, nesiguran i teturav hod, zanošenje zadnjim delom tela, hod na vrhovima papaka. Često je uočeno da prase prilazi valovu sa vodom, zagnjuri njušku ali voda se vraća napolje, jer ne može da guta (paraliza farinksa). Narednog 9 dpi kod praseta br. S6 je zabeležen pad telesne temperature (39.5 °C). Međutim, 10 dpi jedinka br. S6 je prestala da jede, izraženo ležanje, teturav nesiguran hod, ukrštanje zadnjih ekstremiteta, vlažan kašalj, sa daljim padom vrednosti telesne temperature (39.1 °C). Kod praseta br. S6 11 dpi su zabeleženi konjunktivitis, letargija, 39.1 °C, drhtanje, profuzan proliv, hod na vrhovima papaka i pareza zadnjih nogu. Tek 12 dpi je zabeleženo kliničko oboljenje br. S5: febra (41.0 °C), apatija, ležanje, konjunktivitis, iscedak u medijalnom očnom uglu i afonija. Istog dana kod br. S6 su utvrđeni: 39.1 °C, dispnoja, kašalj, serozan iscedak iz nosa, teturav nesiguran hod, ukrštanje zadnjih ekstremiteta, padanje, hodanje

unazad, posrtanje. Prase br. S6 je uginulo 13 dpi dok su kod jedinke br. S5 istog dana utvrđena febra (41.2 °C), letargija, ležanje, otok kapaka, konjunktivitis, dispnoja, hod na vrhovima papaka, profuzan proliv. Narednih dana (14-16 dpi) usledilo je intenziviranje kliničkih simptoma uz febru (41 °C), parezu zadnjih ekstremiteta i povraćanje žutog penušavog sadržaja. U daljem toku 16 i 17 dpi je perzistirala pireksija (40.5-41 °C), afonija, izražen otok očnih kapaka, cijanoza rila i eritem kože (ušiju, butova, kolena, tarzusa i karpusa, oko prepucijuma, ventralnog dela abdomena), tačkasta krvarenja po koži ušiju, teška letargija i uginuće 18 dpi.

**Grafikon br. 2.** Vrednosti telesnih temperatura direktno i kontaktno inficirane prasadi iz III-sumnjive-K grupe



## Druga faza eksperimentalnog ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine

### a) I - pozitivna - E2 grupa

#### -direktna infekcija (prasad br. 22-28)

U okviru ove grupe nakon veštačke infekcije, 2 dpi kod praseta br. 27 klinički su bili prisutni znaci apatije i inapetenca. Nakon toga, 3 dpi zabeležena je febra (41.5 °C), praćena pogoršanjem opšteg stanja i pojavom nervnih simptoma (padanje, ukočena muskulatura, trzaji muskulature koji progresivno napreduju u intenzitetu do konvulzija, epileptiformni napadi, veslanje nogama, iskolačene oči, pena na usta, rika) nakon čega je sledila potpuna iznemoglost, dahtanje, ležanje, skoro besvesno stanje. Tokom 4 i 5

dpi usledio je period intenziviranja nervnih simptoma sa znacima iznemoglosti, febrom (41.0 °C i 40.9 °C). Jedinka je uginula 6 dpi u stanju krajnje iznemoglosti, dehidracije. Kod preostalih jedinki samo su 3 i 4 dpi uočeni klinički znaci blage inapetence, ležanje, bez febre. Do kraja eksperimentalnog ispitivanja u grupi nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

**-indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S7 i S8)**

U grupi neimune prasadi (br. S7 i S8) izložene kontaktnoj infekciji u ispitivanom periodu nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

**b) II - negativna – E2 grupa**

**-direktna infekcija (prasad br. 29-35)**

Nakon veštačke infekcije, 2, 3 i 4 dpi cela grupa je slabije konzumirala hranu, sa izraženom apatijom i ležanjem i kod prasadi br. 30, 32, 35 je zabeležena blaga febra (40 °C, 40.3 °C i 40.1 °C). Nakon toga, do kraja eksperimentalnog ispitivanja u grupi nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

**-indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S9 i S10)**

U grupi neimune prasadi (br. S9 i S10) izloženih kontaktnoj infekciji u ispitivanom periodu nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

**c) III - sumnjiva – E2 grupa**

**-direktna infekcija (prasad br. 36-42)**

Nakon veštačke infekcije, 3 i 4 dpi je zabeležena febra kod prasadi br. 36 (40.6 °C) i br. 39 (40.8 °C) i slabiji interes za hranu. Do kraja eksperimentalnog ispitivanja u grupi nisu utvrđeni klinički znaci KKS. Jedinka br. 36 je od 10 dpi bolovala i uginula 19 dpi sa kliničkim znacima teškog respiratornog oboljenja (dispnoja, kašalj, šištanje pri disanju, gnojni iscedak iz nozdrva, pseći sedeći stav).

**-indirektna (kontaktna) infekcija (prasad br. S11 i S12)**

U grupi neimune prasadi (S11, S12) koja su bila izložena kontaktnoj infekciji u ispitivanom periodu nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

**Kontrolna grupa prasadi**

Nakon i/m infekcije virusom KKS prasadi kontrolne grupe (br. K/1- K/6), prvi porast telesne temperature je ustanovljen kod 4 jedinke već 2 dpi (br. K/1-40.8 °C; br. K/2-41.4 °C; br. K/3-40.6 °C i br. K/4-40.5°C) dok je kod preostale dve (br. K/5 i K/6)

ista utvrđena 3 i 4 dpi (41.5 °C i 40.8 °C). Telesne temperature prasadi su bile kontinuirano povišene (*febris continua*), sa padom na fiziološke i subnormalne vrednosti pre uginuća. Prvi klinički simptomi kod prasadi iz ove grupe su utvrđeni 2 i 3 dpi: smanjen apetit i gubitak apetita, apatija, letargija, konjunktivitis, opstipacija, ležanje. Pojava proliva je zabeležena kod dva praseta 4 dpi (br. K/2 i K/3) i kod preostalih 5 i 6 dpi. Izraženi znaci afonije su se javili kod svih jedinki 6 dpi. Kod 3 praseta od 6 dpi dominirali su lokomotorni poremećaji sa znacima ataksije i posteriorne pareze (br. K/1, K/2 i K/5), dok je kod preostalih u grupi do uginuća dominirala posteriorna pareza i paraliza sa konvulzijama. Kod svih prasadi su zabeležene promene po koži u vidu cijanoze, eritema i izraženih krvarenja od 5 dpi do uginuća. Tok bolesti je u kontrolnoj grupi bio akutan sa uginućem 10 dpi (br. K/3, K/4), 11 dpi (br. K/5, K/6) i 13 dpi (br. K/1, K/2).

### **5.7. Rezultati pregleda organa i tkiva na prisustvo virusa klasične kuge svinja**

Imunoenzimskom tehnikom (ELISA test) ukupno je pregledano 300 uzoraka organa i tkiva, dok je RT-PCR tehnikom pregledano ukupno 49 uzoraka poreklom od prasadi kod kojih je prvom metodom utvrđen pozitivan i sumnjiv nalaz. Postignuti rezultati pregleda organa i tkiva su prikazani u tabelama br. 8 i 9.

#### **Prva faza eksperimentalnog ispitivanja primenom vakcine sa K-sojem virusa KKS**

##### **a) I - pozitivna – K grupa**

##### **- direktna infekcija**

Kod praseta br. 1 u svim ispitanim uzorcima organa ELISA testom je utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. Na suprot tome, kod praseta br. 2 u ispitanim uzorcima organa nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. Kod preostale prasadi u grupi, pregledom uzoraka organa ELISA testom utvrđeno je prisustvo antigena virusa KKS ili sumnjiva reakcija u jednom od ispitanih uzoraka: kod prasadi br. 3 i 5 utvrđen je pozitivan nalaz u mandibularnom limfnom čvoru dok je kod praseta br. 4 i 7 pozitivan nalaz utvrđen pregledom tkiva bubrega. Kod 2 praseta ustanovljen je sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS (prase br. 6 - tonzile i prase br. 7 - mandibularni limfni čvor i terminalni ileum).

Pregledom navedenih organa prasadi RT-PCR tehnikom, kod jedinki br. 1, 5, 6 i 7 pozitivan odnosno sumnjiv nalaz ELISA testom je potvrđen RT-PCR-om. Na suprot

tome, kontrolom uzoraka praseta br. 3 i br. 4, pozitivan nalaz nije potvrđen tehnikom RT-PCR.

**- indirektna (kontaktna) infekcija**

U svim ispitanim uzorcima organa punoprijemčive prasadi br. S1 i S2, ELISA testom ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS.

**b) II - negativna - K grupa**

**- direktna infekcija**

U ispitanim uzorcima organa prasadi br. 8, 9, 10, 11, 12, 13 i 14, ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

**- indirektna infekcija**

U ispitanim uzorcima organa prasadi br. S3 i S4, ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

**c) III - sumnjiva - K grupa**

**- direktna infekcija**

Pregledom uzoraka organa ELISA testom na prisustvo antigena virusa KKS, kod dva praseta (br. 15 i 16) u ispitanim uzorcima tkiva slezine ustanovljen sumnjiv nalaz, dok je kod jedinke br. 15 ustanovljen i pozitivan nalaz pregledom mandibularnog limfnog čvora. Kod praseta br. 17 pozitivan nalaz je utvrđen u tonzilama, bubregu i terminalnom ileumu. Slična distribucija antigena je utvrđena i pregledom uzoraka praseta br. 19 i 21 sa razlikom što je u tkivu tonzila i mandibularnom limfnom čvoru utvrđen sumnjiv nalaz. U ispitanim uzorcima jedinke br. 20, pozitivan nalaz je utvrđen pregledom mandibularnog limfnog čvora, dok je u tkivu tonzila, slezine i terminalnom ileumu utvrđen sumnjiv nalaz. Kod praseta br. 18 u ispitanim uzorcima organa nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. Tehnikom RT-PCR pregledani su gore navedeni uzorci i pozitivan ili sumnjiv nalaz je potvrđen kod svih prasadi izuzev praseta br. 15.

**- indirektna (kontaktna) infekcija**

Pregledom organa neimune prasadi izložene kontaktnoj infekciji, ELISA testom kod jedinke br. S5 u uzorcima tonzila, mandibularnog limfnog čvora i terminalnog ileuma utvrđeno je prisustvo antigena virusa KKS, dok je pregledom tkiva slezine i bubrega utvrđen sumnjiv nalaz. Kod praseta br. S6 pregledom tkiva bubrega ustanovljen je sumnjiv nalaz dok je u preostalim uzorcima organa i tkiva utvrđen pozitivan nalaz.



**Tabela br. 8.** Rezultati ispitivanja ELISA testom odnosno RT-PCR tehnikom na prisustvo i distribuciju antigena odnosno genoma virusa KKS kod prasadi vakcinisanih K-sojem

grupa	Br. praseta	tonzile		slezina		bubreg		mandibularni limfni čvor		ileum	
		+	⊕	+	⊕	±	⊕	+	⊕	+	⊕
I-poz-K	1	+	⊕	+	⊕	±	⊕	+	⊕	+	⊕
	2	-		-		-		-		-	
	3	-		-		-		+	∅	-	
	4	-		-		+	∅	-		-	
	5	-		-		-		+	⊕	-	
	6	±	⊕	-		-		-		-	
	7	-		-		+	⊕	±	⊕	±	⊕
	S1	+		+		+		+		+	
	S2	+		+		+		+		+	
II-neg-K	8	-		-		-		-		-	
	9	-		-		-		-		-	
	10	-		-		-		-		-	
	11	-		-		-		-		-	
	12	-		-		-		-		-	
	13	-		-		-		-		-	
	14	-		-		-		-		-	
	S3	-		-		-		-		-	
	S4	-		-		-		-		-	
III-sum-K	15	-		±	∅	-		+	∅	-	
	16	-		±	⊕	-		-		-	
	17	+	⊕	-		+	⊕	-		+	⊕
	18	-		-		-		-		-	
	19	±	⊕	-		-		±	⊕	+	⊕
	20	±	⊕	±	⊕	-		+	⊕	±	⊕
	21	+	⊕	-		-		±	⊕	+	⊕
	S5	+		±		±		+		+	
	S6	+		+		±		+		+	

(+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS (ELISA test); (⊕) - pozitivan nalaz RT-PCR; (∅) - negativan nalaz RT-PCR

### Druga faza eksperimentalnog ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine

#### a) I - pozitivna - E2 grupa

#### - direktna infekcija

U okviru ove grupe kod 3 praseta je ELISA testom utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS: kod praseta br. 22 u mandibularnom limfnom čvoru i br. 25 i 28 u

terminalnom ileumu. Kod jedinke br. 23 utvrđen je sumnjiv nalaz pregledom tkiva bubrega. Kod preostale prasadi u grupi (br. 24, 26, 27) u ispitanim uzorcima organa ELISA testom nije ustanovljeno prisustvo antigena virusa KKS. Tehnikom RT-PCR prisustvo virusne RNK je potvrđeno u svim uzorcima gde je utvrđen pozitivni i sumnjivi nalaz na prisustvo antigena virusa (ELISA test).

**- indirektna (kontaktana) infekcija**

U svim ispitanim uzorcima organa prasadi br. S7 i S8, ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

**b) II - negativna – E2 grupa**

**- direktna infekcija**

U uzorcima tkiva slezine i terminalnog ileuma praseta br. 29 ELISA testom je utvrđen sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS dok je kod dva praseta (br. 30 i 33) utvrđen pozitivan nalaz u ispitanom uzorku slezine. Kod preostale prasadi u grupi (br. 31, 32, 34 i 35) u uzorcima organa ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. Pregledom organa prasadi br. 29, 30, 33 RT-PCR tehnikom virusna RNK je utvrđena u svim uzorcima.

**- indirektna (kontaktana) infekcija**

U uzorcima organa neimune prasadi br. S9 i S10 ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

**c) III - sumnjiva – E2 grupa**

**-direktna infekcija**

U uzorcima praseta br. 36 i 41, ELISA testom je utvrđen sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS u tonzilama, slezini, mandibularnom limfnom čvoru odnosno terminalnom ileumu. Takođe u uzorcima praseta br. 38 (tonzile) i br. 40 (slezina i bubreg) utvrđen je sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS. Pozitivan nalaz je ustanovljen kod praseta br. 39 i br. 42 (tonzila i mandibularni limfni čvor). Kod praseta br. 37 u ispitanim uzorcima organa ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. Kontrolom navedenih organa prasadi (br. 36, 38, 40, 41, 42) RT-PCR tehnikom virusna RNK je utvrđena u svim ispitanim uzorcima.

**-indirektna (kontaktana) infekcija**

U svim ispitanim uzorcima organa prasadi br. S11 i S12, ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

**Tabela br. 9.** Rezultati ispitivanja ELISA testom odnosno RT-PCR tehnikom na prisustvo i distribuciju antigena odnosno genoma virusa KKS kod prasadi vakcinisanih subjediničnom vakcinom

grupa	Br. praseta	tonzile		slezina		bubreg		mandibularni limfni čvor		ileum	
I-poz-E2	22	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	-
	23	-	-	-	-	±	⊕	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕
	S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-neg-E2	29	-	-	±	⊕	-	-	-	-	±	⊕
	30	-	-	+	⊕	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	+	⊕	-	-	-	-	-	-
	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III-sum-E2	36	±	⊕	±	⊕	-	-	±	⊕	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	±	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	+	⊕	-	-	-	-	+	⊕	-	-
	40	-	-	±	⊕	±	⊕	-	-	-	-
	41	±	⊕	±	⊕	-	-	-	-	±	⊕
	42	+	⊕	-	-	-	-	+	⊕	-	-
	S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz; (±) sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS (ELISA test); (⊕) - pozitivan nalaz RT-PCR;

#### Kontrolna grupa prasadi

U svim ispitivanim uzorcima organa poreklom od prasadi kontrolne grupe (br. K1-K6), ELISA testom je utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS.

## **5.8. Rezultati patomorfološkog pregleda eksperimentalne prasadi**

Kod uginulih prasadi iz prvog dela eksperimentalnog ispitivanja primenom vakcine sa K-sojem virusa KKS (br.1, S1, S2, S5 i S6), patomorfološkim pregledom su ustanovljene promene karakteristične za KKS (krvarenja po koži, hemoragični limfadenitis, hemoragični infarkti na slezini, tačkasta krvarenja po bubrezima, krvarenja na sluznici mokraćne bešike, tačkasta krvarenja po serozama i mukozama digestivnog trakta). Limfni čvorovi kod svih prasadi su bili uvećani, intenzivno crvene ili tamno crvene boje, sa petehijalnim krvarenjima, najčešće u kori. Dalje, kod uginulih prasadi ističe se i nalaz difteroidno – nekrotičnog tonzilitisa i tačkastih krvarenja na sluznici epiglotisa. Međutim, i kod prasadi koja su preživela eksperimentalnu infekciju iz I-pozitivne-K grupe i III-sumnjive-K grupe utvrđene su određene promene koje ukazuju na KKS (tačkasta krvarenja po epiglotisu i sluznici mokraćne bešike).

U okviru ispitivanja sa primenom subjedinične vakcine kod uginule prasadi (br. 27 i 36) patomorfološkim pregledom su utvrđene promene karakteristične za KKS. Isto tako, kod prasadi koja su preživela veštačku infekciju i koja su žrtvovana 30 dpi, kod pojedinih jedinki patomorfološkim pregledom utvrđene su promene koje mogu ukazivati na KKS (petehijalna krvarenja na sluznici mokraćne bešike, limfadenitis).

Ustanovljene patomorfološke promene po eksperimentalnim grupama su prikazane u tabelama br. 10, 11, 12, 13, 14 i 15 u prilogu.

## 6. DISKUSIJA

---

U enzootski inficiranim regionima, vakcinacija protiv KKS je važan element kontrole i programi suzbijanja i iskorenjivanja oboljenja uključuju u najvećem broju slučajeva primenu atenuisanih vakcina u populaciji domaćih svinja (78). U Republici Srbiji Pravilnikom o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje zarazne bolesti KKS (Sl. glasnik RS, br.102/09) definisano je da se vakcinacija prasadi obavlja u starosti od 45 do 60 dana; vakcinacija nazimica i krmača najkasnije 15 dana pre svakog pripusta i vakcinacija nerastova dva puta godišnje u intervalu od šest meseci. Vakcinacija svih kategorija svinja se obavlja atenuisanom vakcinom koja sadrži Kina (K) soj virusa KKS.

Pri izboru prasadi za eksperimentalna ispitivanja, 43. dana života izvršena je kontrola prisustva specifičnih (kolostralnih) antitela protiv virusa KKS kod 100 jedinki (ELISA test). Prisustvo kolostralnih antitela je utvrđeno u 44 ispitana uzorka krvnih seruma, u 35 uzoraka nije utvrđeno prisustvo istih i u 21 uzorku specifična antitela protiv virusa KKS su utvrđena na granici detektabilnosti (sumnjiv nalaz).

Smatra se da poluživot kolostralnih antitela varira od 6 do 14 - 17 dana, zavisno od programa vakcinacije krmače majke (91). Titar kolostralnih antitela kod prasadi opada sa uzrastom, pri čemu se početne vrednosti (nakon sisanja kolostruma) razlikuju zavisno od titra antitela u serumu krmača. Rezultati saopšteni u literaturi ukazuju na postojanje velikih individualnih razlika u vrednosti titra antitela u leglima prasadi i među krmačama (76). U uzrastu 14 dana, prasad izluče oko 65% kolostralnih antitela dok se za 28 dana izluči oko 85%. Umanjenje nivoa (katabolisanje) kolostralnih antitela je konstantno unutar jednog legla ali se značajno razlikuje među leglima prasadi (10). Razlike nivoa kolostralnih antitela među prasadima se objašnjavaju i unosom različitih količina kolostruma (52). Prvih 60 ml koje prase posisa nakon rođenja je odlučujuća za količinu resorbovanih kolostralnih antitela, pri čemu je unos kolostruma u prvih 3-6 časova života od najvećeg značaja (50). Međutim, prase koje se zadnje oprasi u velikom leglu, verovatno, neće uspeti da posisa navedenu količinu kolostruma i samim tim, neće steći pasivnu zaštitu kao prasad koja se oprasi prva (68).

Nivo kolostralnih antitela kod prasadi značajno varira od farme do farme, i zbog različitog imunološkog statusa krmača, što ima za rezultat poteškoće u definisanju određenog programa vakcinacije za prasad (50). Za kolostralni imunitet prasadi poreklom od vakcinisanih krmača značajniji je interval između vakcinacije i prašenja, nego učestalost vakcinacija svake krmače odnosno, pasivna zaštita je kvalitetnija ukoliko je navedeni interval duži (69). Ispitivanjem nivoa kolostralnih antitela kod prasadi poreklom od krmača višekratno vakcinisanih K-sojem virusa KKS, utvrđeno prisustvo istih kod 50% prasadi uzrasta 28, 35, 44 i 54 dana (70). Sličan nalaz utvrdili su i Suradhat and Damrongwatanapokin (2003) kontrolom kolostralnog imuniteta prasadi sa farme gde se obavlja vakcinacija K-sojem virusa.

Na osnovu rezultata ispitivanja kolostralnih antitela, neposredno pred vakcinaciju, u prvom delu eksperimentalnog ispitivanja formirane su tri ogledne grupe: pozitivna (utvrđena antitela), negativna (nisu utvrđena antitela) i sumnjiva (utvrđena antitela na granici detektabilnosti), koje su vakcinisane K-sojem virusa KKS 45. dana života i veštački inficirane 14 dpi.

Ispitivanjem krvnih seruma 14 dpv odnosno 0 dpi prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS ELISA testom je utvrđeno kod 3 jedinke iz **I-pozitivne-K grupe** (br. 1, 6 i 7) dok je kod preostala 4 praseta utvrđen negativan nalaz. Dva dana nakon veštačke infekcije kod većine prasadi u grupi dominira negativan serološki nalaz izuzev praseta br. 1, 6 dpi (prasad br. 5 i 6) i 8 dpi (br. 3 i 7). Nakon toga od 10. dpi pa do kraja eksperimentalnog ispitivanja kod svih prasadi je utvrđen pozitivan serološki nalaz (tabela br. 1).

Postignuti rezultati u okviru I-pozitivne-K grupe ukazuju na interferenciju kolostralnog imuniteta sa sintezom sopstvenih antitela. Pri tome, razlikuju se dva perioda: prvi period nakon vakcinacije kada pada nivo antitela, zatim drugi period nakon infekcije kada takođe pada nivo antitela i tek od 10. dpi se ustanovljava serokonverzija. Specifična antitela su utvrđena u krvnom serumu kod polovine ispitanih prasadi (0 dpi), ali nakon veštačke infekcije dolazi do neutralizacije antitela virusom (62) i ista nisu više sa sigurnošću utvrđena sve do 10 dpi, kada je usledio aktivni imunološki odgovor i sinteza sopstvenih antitela. Navedeni nalaz je potvrda da

ekspozicija antigenima koje specifična antitela prepoznaju ima za rezultat njihovu potrošnju (neutralizaciju) i uklanjanje iz cirkulacije (74). Interferencija kolostralnih antitela sa replikacijom atenuisanog soja virusa i razvojem aktivnog imuniteta protiv KKS (serumski blok), može biti razlog neuspešne vakcinacije prasadi poreklom od imunih krmača. Smatra se da titar kolostralnih antitela  $\leq 1:32$  ne umanjuje efikasnost vakcinacije atenuisanim sojem virusa KKS (92). Serološki odgovor na vakcinaciju kod prasadi poreklom od imunih krmača se uvećava sa uzrastom zbog pada nivoa kolostralnih antitela: 11% u 5-6 nedelji života, 42% u 7-8 nedelji i 77% u 9-10 nedelji (81).

Prase br.1 je 3 dpi klinički obolelo sa simptomima akutnog toka KKS i uginulo 7 dpi. Kod preostalih jedinki u grupi, zabeleženi su samo blagi simptomi poremećaja opšteg stanja i porast telesne temperature iznad fizioloških vrednosti 2 dpi (prasad br. 3, 4, 5, 6 i 7) i 5 dpi (br. 3, 5, 6). Kontrolom viremije, prisustvo antigena virusa KKS je utvrđeno kod 4 praseta (br. 1, 3, 4, 7) u periodu 4-8 dpi (tabela br. 3). Poređenjem prethodno analiziranih seroloških nalaza sa rezultatima viremije, samo je 8 dpi kod praseta br. 3 utvrđeno istovremeno prisustvo antitela i sumnjiv nalaz na viremiju (ELISA test).

Imunoenzimski test predstavlja osetljivu metodu za rano utvrđivanje infekcije i virus KKS je moguće utvrditi u krvi pre pojave kliničkih simptoma koji ukazuju na KKS (5). Međutim, problem je kratak vremenski period trajanja viremije (virus se brzo povlači iz krvi) i prisutna antitela koja neutrališu virus. U slučaju kada je ELISA testom dobijen sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi, prisustvo virusne RNK u krvi vakcinisane inficirane prasadi je utvrđeno RT-PCR metodom, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o većoj osetljivosti metode (39).

Kontrolom uzoraka ORF i RE briseva na prisustvo virusne RNK 2-10. dpi, pozitivan nalaz je utvrđen kod svih prasadi koja su imala pozitivan nalaz na prisustvo antigena virusa KKS u krvi odnosno virusne RNK (tabela br. 6). Čak i kod prasadi (br. 5 i 6) kod kojih nije utvrđena viremija, utvrđeno je prisustvo virusne RNK u uzorcima RE briseva 4 i 6 dpi. Prisustvo virusne RNK je kod praseta br. 1 utvrđeno u svim ispitanim uzorcima ORF i RE briseva 4 i 6 dpi, što je u skladu sa zabeleženim pogoršanjem opšteg stanja i izraženim kliničkim znacima KKS u tom periodu.

Navedeni nalaz predstavlja potvrdu stava da su jedinke obolele u najtežoj formi i najveći izvor zaraze (60).

Patomorfološkim pregledom nakon uginuća praseta br. 1 ustanovljena su krvarenja srednjeg stepena izraženosti, većinom u organima digestivnog trakta (hemoragična dijateza), za koje je saopšteno od drugih autora da su karakteristika KKS (84), pri čemu se ističe nalaz promena koje se smatraju karakterističnim za KKS: difteroidno-nekrotični tonzilitis, tačkasta krvarenja po bubrezima, krvarenja po serozama i mukozama digestivnog trakta (naročito debelog creva) i hemoragični infarkti na slezini (88). Ustanovljeni nalaz je u skladu sa literaturnim podacima da su vaskularne promene u akutnom toku KKS najizraženije u limfnim čvorovima, slezini, bubrezima i gastrointestinalnom traktu (84). Kod preostale vakcinisane veštački inficirane prasadi u grupi iako nisu utvrđeni izraženi klinički znaci KKS, patomorfološki je kod svake pojedine jedinke utvrđena jedna od, za dijagnostiku KKS, značajna patološka promena (petehijalna krvarenja na sluznici epiglotisa i sluznici mokraćne bešike, hemoragični infarkti na slezini) (tabela br. 10). Svakako da to ne predstavlja nalaz specifičan za KKS i samo na osnovu patološkog nalaza ne bi se postavila sumnja na KKS, što ukazuje na problem ranog otkrivanja KKS patomorfološkim pregledom uginulih ili žrtvovanih svinja (38).

Kontrolom uzoraka organa i tkiva na prisustvo antigena virusa (ELISA test) odnosno virusne RNK (RT-PCR), prisustvo antigena virusa nije utvrđeno kod praseta br. 2, kod koga nije utvrđena viremija niti izlučivanje virusa. S obzirom na kliničku sliku i tok bolesti, sasvim očekivan je pozitivan nalaz u svim ispitanim uzorcima organa praseta br. 1. Kod preostalih jedinki u grupi pozitivan nalaz ELISA testa i RT-PCR tehnike je utvrđen u najmanje jednom ispitanom uzorku. U celini gledano, najveći broj pozitivnih rezultata je zabeležen kontrolom uzoraka mandibularnih limfnih čvorova, zatim tonzila, bubrega i terminalnog ileuma dok je samo kod jedinke br. 1 utvrđen antigena virusa odnosno virusna RNK u tkivu slezine.

Slične rezultate su ustanovili Suradhat i Damrongwatanapokin (2003). Nakon veštačke infekcije visoko virulentnim sojem virusa 13 dpv K-sojem, u grupi prasadi sa visokim nivom kolostralnih antitela kod 50% prasadi su 6 dpi utvrđeni blagi klinički simptomi KKS, virus je izolovan iz krvi i organa obolelih jedinki. Nije utvrđena zaštita od veštačke infekcije kod jedinki sa visokim titrom kolostralnih antitela (1:64) dok u



grupi sa nižim titrom ( $1:<64$ ) jeste. Smatra se da se optimalna zaštita postiže vakcinacijom prasadi sa titrom kolostralnih antitela  $\leq 1:32$  (77). Pri navedenoj vrednosti titra izostaje izlučivanje ili prenošenje virusa KKS na svinje u kontaktu (81).

Jedan dan nakon veštačke infekcije u cilju utvrđivanja značaja vakcinisanih i inficiranih jedinki u pogledu izlučivanja i opasnosti od daljeg širenja virusa KKS (pojava sekundarnih žarišta oboljenja), svakoj grupi su dodana po 2 nevakcinisana praseta, poreklom od nevakcinisanih krmača. Nesumnjiv dokaz da su jedinke u okviru I-pozitivne-K grupe izlučivale virus KKS (klinički i latentno inficirane kliconoše) u količini dovoljnoj za kontaktnu infekciju predstavlja oboljenje i uginuće neimune prasadi br. S1 i S2. Kod ovih jedinki prvi klinički znaci bolesti i prvi pozitivan nalaz viremije su utvrđeni 8 dpi. Nakon toga, usledio je karakterističan akutni tok KKS neimunih jedinki inficiranih virulentnim sojem virusa Beker (70). Pri tome, naročito su bili izraženi znaci poremećaja funkcije CNS-a (škripanje zubima, konvulzije, veslanje nogama), koji po opisu odgovaraju neurološkim znacima KKS u literaturi (45). Utvrđene vrednosti telesnih temperatura i kliničke manifestacije bolesti odgovaraju karakteristikama akutnog toka KKS (11).

Kod neimune kontaktno inficirane prasadi nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u ispitivanom periodu do 18 odnosno 20 dpi. Smatra se da se specifična antitela koja neutrališu virus KKS ustanovljavaju najranije 14 dpi (11). Međutim, svinje inficirane visoko virulentnim sojem virusa mogu uginuti pre detektabilnog imunog odgovora (97). Kontrolom krvnih seruma D-ELISA testom, kod prasadi br. S1 i S2 utvrđena je sumnjiva reakcija na prisustvo  $E^{ms}$  antitela neposredno pre uginuća tj. 16 dpi (br. S2) i 18 dpi (br. S1). Naveden nalaz je u saglasnosti sa rezultatima Dewulf et al. (2002) koji su ustanovili da se antitela protiv glikoproteina  $E^{ms}$  detektuju u proseku 17.2 dpi. Kod kontaktno inficirane prasadi viremija je prvi put utvrđena 8 dpi (br. S1) i 10 dpi (br. S2).

U eksperimentalnom istraživanju Prodanov et al. (2007), viremija kod kontaktno inficirane, nevakcinisane prasadi poreklom od nevakcinisanih krmača je utvrđena prvi put 11 dpi (ELISA test) dok su Laevens et al. (1998) istu ustanovili 12 i 14 dpi. Na različite rezultate navedenih autora, svakako utiču i različiti sojevi virusa (visoko i srednje virulentni) primenjeni za veštačku infekciju (23). S obzirom na to da su jedinke br. S1 i S2 pre početka eksperimentalne infekcije bile serološki negativne i da su

poreklom od krmača nevakcinisanih protiv KKS, poređenjem sa literaturnim izvorima viremija je ELISA testom ustanovljena ranije (8 i 10 dpi) u odnosu na eksperimentalne rezultate gore navedenih autora.

Prasad su uginula 16 dpi (br. S2) odnosno 20 dpi (br. S1). Pored krvarenja, patomorfološkom slikom su dominirale zapaljenske promene u digestivnom (hemoragično-difteroidni gastritis i kolitis) i respiratornom sistemu (pneumonija) (tabela br. 10). S obzirom da virus KKS nakon infekcije dovodi do razvoja imunosupresije, česte su sekundarne bakterijske infekcije digestivnog i respiratornog trakta, koje mogu maskirati većinu promena tipičnih za KKS (62). Kontrolom prisustva antigena virusa KKS, isti je utvrđen u svim ispitanim uzorcima organa i tkiva prasadi br. S1 i S2.

Glavni put širenja virusa KKS je direktni kontakt obolele i prijemčive svinje (61) i u prirodnim uslovima, svinje se inficiraju oronazalnim putem (4). Nakon infekcije svinja visoko virulentnim sojem, virus KKS je prisutan u krvi i organima i velike količine se izlučuju sekretima (oronazalni i lakrimalni) i ekskretima (urin, feces), pri čemu se izlučivanje može javiti i bez postojanja kliničkih znakova oboljenja (88). Izlučivanje virusa se nastavlja do uginuća, ili u slučaju preživljavanja, do pojave specifičnih antitela u krvi (89). U okviru našeg istraživanja, kontrolom uzoraka ORF i RE briseva od svakog vakcinisanog veštački inficiranog praseta unutar grupe, ispitan je značaj pojedinačne jedinke u pogledu izlučivanja i opasnosti od daljeg širenja virusa KKS. Međutim, Terpstra i Wensvoort (1988) su eksperimentalno potvrdili da se virus KKS može preneti sa direktno inficiranih na nevakcinisane jedinke u kontaktu, iako ni u jednom ispitanom uzorku oronazalnog sekreta nije utvrđeno prisustvo virusa KKS. Kod neimune prasadi (br. S1 i S2) infekcija se odvijala po modelu prirodne infekcije (oronazalna) i virulentnost virusa je imala najveći uticaj na klinički tok oboljenja. Ukoliko se u razmatranje uzme u obzir činjenica da su vakcinisana inficirana prasad br. 1, 2, 3, 4, 5, 6, i 7 počeli da izlučuju virus KKS 4 dpi (iako je moguće izlučivanje virusa KKS i tokom perioda inkubacije), protekao je period od 4 dana do prvog sumnjivog odnosno pozitivnog rezultata na prisustvo antigena virusa KKS u krvi kontaktno inficirane neimune prasadi. Smatra se da u proseku 4 dpi zaražena jedinka postaje infektivna (49), iako inicijalna viremija nastaje 16-24 časa nakon infekcije (84).

Kontrolom krvnih seruma jedinki **II-negativne-K grupe** 14 dpv odnosno 0 dpi, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS (ELISA test) je utvrđeno samo kod jednog praseta (br. 13) dok je kod preostale prasadi utvrđen sumnjiv (br. 8, 9, 11, 12, 14) odnosno kod praseta br. 10 negativan nalaz (tabela 1). Utvrđivanjem dinamike perzistencije specifičnih antitela nakon veštačke infekcije, kod najvećeg broja prasadi 2 i 4 dpi ista su utvrđena ispod granice detekcije, izuzetak je prase br. 13 (4 dpi). Međutim, od 6 dpi i do kraja eksperimenta, u ispitivanoj grupi dominira pretežno pozitivan serološki nalaz.

U okviru II-negativ-K grupe, samo je 3 dpi zabeležen skok telesne temperature kod prasadi br. 11 i 14. Sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa KKS je utvrđen 4 dpi (prase br. 11 i 14) i 6 dpi (prase br. 10). Kontrolom navedenih uzoraka krvi i uzoraka ORF i RE briseva, nije utvrđeno prisustvo virusne RNK (RT-PCR). Patomorfološkim pregledom nakon žrtvovanja prasadi 30 dpi, nisu utvrđene patološke promene karakteristične za KKS. U ispitanim uzorcima organa prasadi, ELISA testom nije utvrđeno prisustvo antigena virusa KKS. U skladu sa navedenim nalazima su i rezultati kliničke kontrole, uzoraka krvi i organa prasadi br. S3 i S4 odnosno nije ustanovljena kontaktna infekcija u II-negativnoj-K grupi.

Vakcinacija prasadi u prisustvu kolostralnih antitela ima za rezultat varijabilni imunološki status, zavisno od koncentracije istih u vreme vakcinacije. U prisustvu visokih koncentracija kolostralnih antitela, izostaje imunološka stimulacija i prasad nisu otporna na veštačku infekciju. Uzrast i nivo kolostralnih antitela su parametri aktivnog imunološkog odgovora prasadi nakon vakcinacije. Sinteza sopstvenih antitela (aktivni imunitet) u prisustvu kolostralnih antitela izostaje ili je slaba. U prisustvu niskog nivoa kolostralnih antitela, prasad imaju zakasnelu i slabu primarnu produkciju antitela ali su otporna na veštačku infekciju. Vakcinacija je efikasna kada neutralizaciona aktivnost kolostralnih antitela u serumu padne ispod određene vrednosti, koja se označava kao "prag efikasne vakcinacije" (53). Visok nivo kolostralnih antitela suprimira sintezu sopstvenih antitela nakon vakcinacije. Smatra se da za serološki odgovor, kolostralna antitela treba da opadnu na titar oko 1:14, što se dostiže u uzrastu od 8 do 9 nedelja. Nakon veštačke infekcije virulentnim sojem virusa vakcinisanih svinja javlja se sekundarni imunološki odgovor usled umnožavanja virusa, što je kod 57% svinja praćeno febrom. Aktivni imunitet vakcinisanih svinja treba da blokira kruženje

terenskog soja virusa i onemogućiti kliconoštvo (81). U II-negativnoj-K eksperimentalnoj grupi nije utvrđena interferencija kolostralnih antitela sa aktivnim imunitetom nakon vakcinacije prasadi K-sojem virusa KKS. Takođe, kontinuiranom kontrolom viremije, izlučivanja virusa i antigena virusa u uzorcima organa i tkiva nije utvrđena latentna infekcija i kliconoštvo inficirane prasadi.

U **III-sumnjivoj-K grupi**, u okviru koje su na dan vakcinacije utvrđena kolostralna antitela na granici detekcije, kontrolom 14 dpv (0 dpi) sumnjiv nalaz na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS je utvrđen kod tri jedinke (br. 15, 17, 20) dok je kod preostale prasadi serološki rezultat bio negativan. Navedeni nalaz potencijalno ukazuje na delimičnu neutralizaciju kolostralnih antitela antigenom atenuisanog soja virusa nakon vakcinacije 45. dana života. U daljem toku 2-4 dpi utvrđen je negativan serološki nalaz (izuzev praseta br. 20, sumnjiv nalaz). Od 6 do 8 dpi pa do kraja eksperimentalnog ispitivanja u uzorcima krvnih seruma ispitivane prasadi dominira pozitivan serološki nalaz (ELISA test).

Već 2 dpi je kod 4 jedinke (br. 15, 16, 18, 20) zabeležena pireksija, uz blage simptome poremećaja opšteg stanja. Narednog dana (3 dpi) klinički simptomi oboljenja su utvrđeni samo kod praseta br. 20, sa tendencijom pogoršanja sve do 6 dpi (apatija, drhtanje, ležanje, proliv). Pored toga 4-6 dpi utvrđena je blaga pireksija, znaci apatije, inapetence i kod prasadi br. 17, 18 i 19. Međutim, 7 i 8 dpi je usledilo kliničko poboljšanje kod svih jedinki. Na suprot navedenom, 9 dpi je zabeležen ponovni skok telesne temperature praseta br. 20 sa izraženim znacima konjunktivitisa, otoka očnih kapaka, apatije, inapetence, tremora muskulature. Klinički znaci apatije i inapetence su utvrđeni još 10 i 11 dpi kod jedinki br. 19 i 20. Nakon toga, od 12 dpi pa do kraja eksperimentalnog ispitivanja nisu utvrđeni klinički znaci KKS.

Kontrolom prisustva antigena virusa KKS u krvi (ELISA test), viremija je utvrđena kod praseta br. 15 (6 dpi), br. 17 (4 dpi), br. 19 (8 dpi) i br. 20 (4, 6, 8 dpi). Od značaja je nalaz kod jedinke br. 20, kod koje su u okviru grupe utvrđeni izraženi nespecifični klinički znaci oboljenja. Pozitivan nalaz ELISA testa je u svim ispitivanim danima potvrđen tehnikom RT-PCR odnosno utvrđeno je prisustvo virusne RNK. Analizom navedenih rezultata kod prasadi br. 15 (6 dpi), 19 (8 dpi) i br. 20 (4, 6, 8 dpi) u istom danu utvrđeno je i prisustvo antigena virusa i specifičnih antitela u krvi.

Istovremeno ustanovljavanje antitela i virusa u krvi je saopšteno od strane Depner et al. (2000), dok drugi autori (11) navode da je samo u slučaju hronične infekcije moguće utvrđivanje virusa i specifičnih antitela u krvi. Specifična antitela se mogu privremeno utvrditi u uzorcima krvnih seruma, jer imunološki sistem otpočinje sa sintezom, iako nije moguća eliminacija virusa iz organizma. Posledično virus neutrališe antitela i ona se serološki ne ustanovljavaju (62). Postignuti rezultati naših ispitivanja ukazuju da je istovremeno utvrđivanje prisustva virusa i specifičnih antitela u krvi moguće kod akutno i supklinički inficiranih svinja.

Kontrolom briseva, prisustvo virusne RNK je utvrđeno u uzorcima jedinke br. 19 i 20, kod kojih je utvrđena i viremija i nespecifični znaci bolesti. Kod praseta br. 20 je u kontinuitetu (2, 4, 6 dpi) utvrđeno prisustvo virusne RNK u uzorcima ORF i RE briseva. Međutim, od značaja je pozitivan nalaz kod prasadi br. 16 i 21, kod kojih nije utvrđena viremija ali jeste izlučivanje virusa u uzorcima RE brisa, 4 dpi.

Patomorfološkim pregledom prasadi grupe III-sumnjiva–K, utvrđene su pojedinačne patološke promene (petehijalna krvarenja po epiglotisu, sluznici mokraćne bešike i sluznici želuca), patomorfološki nalaz koji nije specifičan za KKS. Ispitivanje prisustva antigena virusa KKS u uzorcima organa i tkiva prasadi (ELISA test), negativan nalaz je utvrđen samo kod praseta br. 18. Sumnjiv odnosno pozitivan rezultat nije potvrđen prisustvom virusne RNK samo kod praseta br. 15 (tabela br. 8). Kod ove jedinke nije utvrđeno izlučivanje virusa ali je ustanovljena viremija 6 dpi. Kod preostalih jedinki u grupi, u svim slučajevima sumnjivog ili pozitivnog rezultata ELISA testa, potvrđeno je i prisustvo virusne RNK (RT-PCR). U odnosu na distribuciju antigena virusa u celoj grupi, pozitivan nalaz je utvrđen u najvećem broju ispitanih uzoraka tonzila i terminalnog ileuma, zatim mandibularnog limfnog čvora, slezine i najmanji broj u ispitivanim uzorcima tkiva bubrega.

Enzootsku infekciju virusom KKS karakteriše inaparentni tok i nizak mortalitet. Kod uginulih životinja se ne ustanovljavaju patomorfološke promene karakteristične za KKS. Najčešći nalaz na obdukcijom pregledu su petehijalna krvarenja na serozama, retko krvarenja na bubrezima, intestinalne i pulmonalne lezije koje patomorfološki odgovaraju salmonelozi i pasterelozi (63). Virus uzrokuje imunološku supresiju, i nastaju sekundarne infekcije koje mogu maskirati promene tipične za KKS (62). U tim slučajevima, sumnja na KKS se i ne postavlja jer se smatra da vakcinisane svinje ne

moгу oboleti. Na ovaj naćin virus KKS se enzootski odrųava u vakcinisanom zapatu svinja (63).

U cilju kontrole izlućivanja virusa, prijemćive nevakcinisane jedinke (br. S5 i S6) su smeštene na naćin koji omogućava direktni kontakt sa inficiranim. Nesumnjiv dokaz da su vakcinisane inficirane jedinke u III-sumnjivoj-K grupi izlućivale virus KKS (klinićki i latentno inficirane kliconoše) u kolićini dovoljnoj za kontaktnu infekciju predstavlja oboljenje i uginuće neimune prasadi. Kod ovih jedinki prvi klinićki znaci bolesti su ustanovljeni 6 dpi (br. S6) i 12 dpi (br. S5) dok je prva sumnja (br. S5) odnosno pozitivan nalaz (br. S6) na viremiju utvrđen 10 dpi. Antigen virusa KKS je u uzorcima krvi mogao da se dokaųe do uginuća. Klinićki je zabeleųen akutni tok KKS koji po karakteristikama odgovara toku bolesti kod neimunih jedinki kontaktno inficiranih virulentnim sojem virusa Beker (70). Kod neimune prasadi nije utvrđeno prisustvo specifićnih antitela i antitela protiv glikoproteina E<sup>rns</sup> virusa KKS u ispitanim uzorcima do uginuća (20 odnosno 14 dpi). Sasvim je oćekivano i da se ne utvrdi serokonverzija na E<sup>rns</sup> antitela pre uginuća, usled imunosupresivnog dejstva virusa (86). U svim ispitivanim uzorcima organa i tkiva prasadi br. S5 i S6 ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS (ELISA test), što je u saglasnosti sa podacima da se visoko virulentni virus moųe utvrditi u većini organa 5 - 6 dana posle infekcije (88). Visoko virulentni sojevi se brzo šire u organizmu i replikuju u visokom titru u vecini organa naroćito u tonzilama, limfnim ćvorovima, slezini i krvi (95).

Inficirana svinja je najvaųniji rezervoar virusa KKS (95) a na kolićinu izlućenog virusa i prenošenje KKS utice virulencija soja virusa, tok bolesti, imunološki status (72) kao i intenzitet i ućestalost kontakta inficirane i prijemćive jedinke. Oronazalni sekret ima najveći znaćaj u kontaktnoj infekciji jer instinktivno ponašanje svinja podrazumeva oralno i nazalno istraųivanje ambijenta (98). Utvrđeno je da visoko virulentan virus preųivljava 6 dana u fecesu, odnosno 2 dana u urinu na temperaturi 22 °C, što su ujedno i orjentacione vrednosti prosećne dnevne temperature u vreme našeg eksperimentalnog istraųivanja. Feces i urin svinja inficiranih visoko virulentnim virusom sadrųi veće kolićine krvi tj. inficirane ćelije koje pogoduju preųivljavanju virusa u spoljašnjoj sredini (94).

U okviru prvog dela eksperimentalnog ispitivanja, izvršena je vakcinacija prasadi u skladu sa zakonom i preporukom proizvođaća vaccine, kako se to na terenu i

zaista obavlja, u cilju ispitivanja nastanka i kvaliteta aktivnog imuniteta, utvrđivanja da li dolazi do interferencije aktivnog i pasivnog imuniteta odnosno da li vakcinisana prasada mogu oboleti od KKS i da li se razvija kliconoštvo (latentna infekcija), koje doprinosi održavanju infekcije virusom KKS u regionu (enzootska infekcija).

Veštačkom infekcijom vakcinisane prasadi iz I-pozitivne-K i III-sumnjive-K grupe utvrđen je klinički ali i supklinički tok KKS (latentna infekcija) sa izlučivanjem virusa. Od najvećeg značaja su jedinke bez kliničkih simptoma KKS, kod kojih je utvrđeno izlučivanje virusa. Pored toga, utvrđeni klinički simptomi kod pojedinih jedinki (blaga febra, inapetenca, apatija) ne bi bili zapaženi u terenskim uslovima. S obzirom na tok bolesti i laboratorijske nalaze neimune prasadi, količina izlučenog virusa je bila dovoljna za kontaktnu infekciju. Vakcinacijom je umanjena replikacija virusa, sprečeno uginuće inficiranih jedinki i umanjeno kontaktno prenošenje virusa. Međutim, „zaštitni“ efekat koji je na neki način „ublažio“ akutni tok KKS, prouzrokovao je razvoj latentne infekcije (kliconoštvo). Klinička zaštita od KKS se ne može smatrati primarnim ciljem, čak je nepoželjna jer prikriva postojeću infekciju kod jedinke koja može predstavljati izvor za pojavu sekundarnih žarišta oboljenja (23).

Na osnovu postignutih rezultata ispitivanja kod prasadi koja su 45. dana života vakcinisana K-sojem virusa KKS, utvrđeno je da kolostralna antitela suprimiraju imunološki odgovor na vakcinalni antigen: što je viši nivo kolostralnih antitela pri vakcinaciji, snažnija je inhibicija razvoja sopstvenog (aktivnog) imuniteta odnosno niži je nivo sinteze sopstvenih antitela nakon veštačke infekcije. Prisustvo kolostralnih antitela u vreme vakcinacije prasadi umanjuje aktivni imunitet, pa kao posledica dolazi do neutralizacije antigena vakcine kolostralnim antitelima. Efekat neutralizacije vakcinalnog antigena ima za posledicu različitost imunološkog odgovora prasadi na vakcinaciju odnosno heterogeno zaštićenu populaciju svinja, u okviru koje može da cirkuliše virus KKS (46). Nivo kolostralnih antitela u vreme vakcinacije K-sojem predstavlja faktor koji određuje budući imunološki status prasadi (78). Međutim, i svinje koje ne odgovore na vakcinaciju mogu biti otporne na veštačku infekciju virulentnim sojem virusa zbog brzog sekundarnog imunološkog odgovora (81).

U inficiranom okruženju (enzootska infekcija), krmače mogu imati visok titar specifičnih antitela usled submorbidne infekcije virulentnim virusom. Njihova prasada imaju viši nivo kolostralnih antitela u poređenju sa prasadima poreklom od vakcinisanih

neinficiranih krmača, koja nakon vakcinacije interferiraju sa aktivnim imunološkim odgovorom (90). Trajanje kolostralnog imuniteta na farmama gde nema infekcije virusom KKS je 3-4 nedelje, međutim kada postoji žarište infekcije, ovaj period je 8-11. nedelja (46). Interferencija kolostralnih antitela sa aktivnim imunitetom prasadi ima za posledicu neefikasnu vakcinaciju, kada nakon infekcije divljim sojem virusa KKS dominira supklinički tok bolesti sa izlučivanjem virusa. Visoke vrednosti kolostralnih antitela do nekog stepena obezbeđuju zaštitu ali je za opadanje njihove koncentracije na vrednosti kada ne interferiraju sa vakcinacijom, potreban duži vremenski period tj. duži je period skrivene prijemčivosti (77). U vakcinisanoj populaciji, zalučena prasadi je najrizičnija kategorija sa aspekta mogućnosti infekcije virusom KKS u kritičnom periodu kada je u pitanju odnos aktivne imunizacije i kolostralnih antitela (57). Iz tog razloga u formulisanju programa imunopofilakse prasadi protiv KKS u uslovima enzootske infekcije značajna su serološka ispitivanja radi sagledavanja imunološkog statusa zapata (77) i procene efikasnosti vakcinacije (12).

Eksperimentalni rezultati ispitivanja zaštitnog nivoa kolostralnih antitela kod prasadi uzrasta 28, 35, 44 i 54 dana poreklom od krmača koje se tokom perioda ekonomskog iskorišćavanja višekratno vakcinišu sa K-sojem, ukazuju da su prasadi samo delimično zaštićene od infekcije virusom KKS, uprkos činjenici da kolostralna antitela još uvek perzistiraju (70). Vakcinacija prasadi bez saznanja o nivou pasivnih antitela, objašnjava prijemčivost populacije za infekciju (46). Zbog interferencije kolostralnih antitela sa vakcinacijom, preporuka je da se prasadi poreklom od vakcinisanih krmača vakcinišu u uzrastu 7-9 nedelja, što se može realizovati u zapatima slobodnim od KKS, ali se ne može primeniti bez rizika u uslovima enzootske infekcije (91). Prasadi su pasivno zaštićene ukoliko se u krvnom serumu nalazi određeni nivo kolostralnih antitela („prag pasivne zaštite“) ali nije neophodno čekati potpuno izlučivanje kolostralnih antitela za vakcinaciju. Vakcinacija prevenira širenje oboljenja i obezbeđuje populaciji imunološki zaštitni „kišobran“ koji kontroliše potencijalni prodor slabo virulentnih sojeva virusa (88). Problem interferencije pasivnog imuniteta sa vakcinacijom prasadi je naročito prisutan u uslovima kada su krmače višekratno vakcinisane protiv KKS (51). Primenom postojećih programa vakcinacije, supklinički inficirane životinje mogu biti prisutne, što doprinosi širenju KKS (35).



U drugom delu eksperimenta, na osnovu rezultata ispitivanja kolostralnih antitela 43. dana života, formirane su tri grupe prasadi: pozitivna (utvrđena kolostralna antitela), negativna (nisu utvrđena kolostralna antitela) i sumnjiva (nalaz antitela na granici detektabilnosti), koje su vakcinisane 45. dana života i nakon 4 nedelje (73. dan života) revakcinisane subjediničnom vakcinom. Ukoliko bi se subjedinična vakcina aplikovala jednokratno, sasvim je jasno da ne bi mogla konkurisati atenuisanoj. Zbog toga su eksperimentalna ispitivanja dizajnirana u skladu sa uputstvom proizvođača vakcine i ispitivanjem drugih autora (86,100). Imunogena svojstva subjedinične vakcine su dobro proučena ali su malobrojna ispitivanja na prasadima poreklom od krmača višekratano vakcinisanih K-sojem virusa KKS.

Kontrolom prisustva specifičnih antitela 0 dpi (14 dpv<sub>2</sub>) u svim eksperimentalnim grupama prasadi utvrđen je pozitivan serološki nalaz, koji je bio kontinuirano prisutan do kraja eksperimentalnog ispitivanja kod svih jedinki (tabela br. 2). Vakcinacija subjediničnom vakcinom indukuje sintezu specifičnih antitela samo protiv glikoproteina E2 virusa KKS (26). Imunološki odgovor nakon aplikacije subjedinične vakcine kasni i ove vakcine su u poređenju sa atenuisanim vakcinama manje protektivne ali se revakcinacijom postiže skok titra antitela koja perzistiraju mesecima (86). Klinička zaštita prasadi nakon jednokratne vakcinacije subjediničnom vakcinom je utvrđena tek 14 dpv<sub>2</sub> (89). Imunitet nakon jednokratne vakcinacije subjediničnom vakcinom obezbeđuje zaštitu od kliničkog oboljenja ali ne i od infekcije i izlučivanja virusa iz organizma vakcinisane inficirane jedinice (38).

U okviru **I-pozitivne-E2 grupe** nakon veštačke infekcije vakcinisane prasadi, 2 dpi zabeležena je febra kod praseta br. 27 i u daljem toku izraženi klinički znaci oboljenja i uginuće 6 dpi. Iako su kod preostale inficirane vakcinisane prasadi 3 i 4 dpi zabeleženi klinički znaci apatije, inapetence, do kraja ispitivanja nije utvrđena KKS. Pregledom krvi ELISA testom, prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđeno 8 dpi kod praseta br. 25, dok je sumnjiv nalaz utvrđen već 4 dpi (br. 27) i 6 dpi (br. 25 i 28). U daljem toku ispitivanja, pozitivan nalaz je zabeležen samo još 10 dpi kod praseta br. 25. Kod preostalih jedinki u grupi, utvrđen je sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi i to: 8 dpi (br. 22 i 26), 10 dpi (br. 23, 26, 28) i 16 dpi br. 25 (tabela br. 4). Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom koje su prethodno pokazale

pozitivan i sumnjiv nalaz (ELISA test), prisustvo virusne RNK nije potvrđeno samo kod praseta br. 26 i br. 28 (10 dpi) (tabela br. 4). Kontrolom uzoraka ORF i RE briseva, prisustvo virusne RNK je utvrđeno kod svih jedinki izuzev br. 24 i 26, kod kojih nije utvrđeno prisustvo virusne RNK u krvi.

Istovremeno ustanovljavanje antitela i virusne RNK predstavlja fenomen koji je zabeležen i od strane Dewulf et al. (2005). Isti autor smatra da svinje koje su samo PCR pozitivne imaju niske vrednosti nivoa prodora virusa u cirkulaciju i ne prenose infekciju horizontalno. U kontroli i eradikaciji KKS umesto antigen ELISA testa preporuka je da se tehnika RT-PCR primenjuje kao rutinska dijagnostička metoda (20).

Patomorfološkim pregledom uginulog praseta br. 27, utvrđene su promene karakteristične za KKS (tonzilitis, petehijalna krvarenja po epiglotisu, hemoragični limfadenitis, petehijalna krvarenja na bubrezima, sluznici mokraćne bešike i po mukozama digestivnog trakta). Kod preostalih prasadi u grupi, sporadično su utvrđena petehijalna krvarenja po sluznici mokraćne bešike (tabela br. 12) odnosno patomorfološki nalaz nije bio specifičan za KKS. Kontrolom uzoraka organa i tkiva, prisustvo antigena virusa KKS (ELISA test) i virusne RNK (RT-PCR) je utvrđeno samo kod prasadi br. 22 (mandibularni limfni čvor), br. 23 (tkivo bubrega), br. 25 i 28 (terminalni ileum). Nalaz u organima navedene prasadi je u saglasnosti sa rezultatima viremije. Negativan nalaz organa i tkiva na antigen virusa KKS kod uginulog praseta br. 27 može biti posledica perakutnog toka bolesti (62).

Iako je u uzorcima ORF i RE briseva kao i u krvi vakcinisane inficirane prasadi utvrđeno prisustvo virusa KKS, nije se odigrala kontaktna infekcija neimune prasadi (br. S7 i S8). Prase br. 27 je uginulo već 6 dpi, što predstavlja kratak tok bolesti. Verovatno da se prenošenje KKS na prijemčive svinje nije odigralo pre svega usled kratkog intervala između infekcije i uginuća obolele jedinke ali i verovatnoće da inficirane svinje nisu izlučivale dovoljno virusa za kontaktnu infekciju i kontaminaciju ambijenta. Slična zapažanja su u svom radu izneli Ribbens et al. (2004).

U okviru **II - negativne – E2 grupe**, 2-4 dpi kliničkim pregledom utvrđen je poremećaj opšteg stanja (blaga febra, ležanje, apatija) kod jedinki br. 30, 32 i 35. Nakon toga, do kraja eksperimentalnog ispitivanja nisu utvrđeni klinički znaci KKS. Pregledom krvi ELISA testom, sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi je prvi

put utvrđen 4 dpi (prase br. 30), zatim 6 dpi (br. 30, 32 i 35) i 10 dpi (br. 32 i 33). Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom u danima kada je ELISA testom utvrđena sumnjiva reakcija, samo kod jedinki br. 30 (4 dpi) i br. 32 (6 dpi) je utvrđeno prisustvo virusne RNK (tabela br. 4). Različiti dani ustanovljavanja viremije kod eksperimentalne prasadi mogu biti posledica činjenice da viremija kratkog trajanja može proći kada se uzorkovanje krvi vrši svaki drugi dan ili je nastala viremija ispod granice detektabilnosti (23). Negativni rezultati ustanovljavanja antigena virusa KKS u krvi mogu biti i posledica nastale neutralizacije virusa (87).

Kontrolom uzoraka ORF i RE briseva, prisustvo virusne RNK je utvrđeno samo kod prasadi br. 29 i 30 (4 i 6 dpi). Patomorfološkim pregledom nakon žrtvovanja 30 dpi, utvrđene su pojedinačne, slabo izražene promene (limfadenitis, krvarenja na sluznici mokraćne bešike) (tabela br. 14). Kontrolom uzoraka organa i tkiva, prisustvo antigena virusa KKS je utvrđeno kod praseta br. 29 (uzorak slezine i terminalni ileum) i u slezini prasadi br. 30 i 33.

Nakon veštačke infekcije prasadi **II - sumnjive – E2 grupe**, 3 i 4 dpi je zabeležena febra i inapaetencija prasadi br. 36 i 39. Jedinka br. 36 je uginula sa nespecifičnim kliničkim simptomima i znacima teškog respiratornog oboljenja 20 dpi. Kod preostale prasadi u grupi do kraja eksperimentalnog ispitivanja nisu utvrđeni klinički znaci KKS. Pregledom krvi ELISA testom, sumnjiv nalaz na prisustvo antigena virusa u krvi (viremija) je prvi put utvrđen 4 dpi (br. 37 i 39), zatim 6 dpi (br. 36) i 10 dpi (br. 38 i 42). Prvi pozitivan nalaz je utvrđen 10 dpi (prase br. 36 i 39). Sumnjiv nalaz je utvrđen još jednom, 16 dpi (br. 42). Pregledom uzoraka krvi RT-PCR tehnikom u danima kada je ELISA testom utvrđen sumnjiv i pozitivan nalaz na prisustvo antigena virusa KKS, viremija je potvrđena kod prasadi br. 36 (6 i 10 dpi), br. 39 (4 i 10 dpi) i br. 42 (10 i 16 dpi). Kontrolom ORF i RE briseva prisustvo virusne RNK je utvrđeno kod tri praseta: br. 36, 39 i 42 (tabela br. 7).

Patomorfološkim pregledom nakon uginuća praseta br. 36 utvrđene su patološke promene koje se smatraju karakterističnim za KKS (difteroidno-nekrotični tonzilitis, petehijalna krvarenja po bubrezima i mukozi digestivnog trakta) ali i izražene promene na respiratornom traktu. Kod preostale prasadi u grupi nisu utvrđene patomorfološke promene indikativne za KKS. Infekcija virusom KKS je imunomodulatorna infekcija i

patognomonične promene su izražene u formi hemoragijskog sindroma i imunosupresije (84). Virus KKS ima imunosupresivno dejstvo i inficirane jedinke uginu kao posledica sekundarnih infekcija (67).

Kontrolom uzoraka organa i tkiva, samo kod praseta br. 37 nije utvrđen pozitivan nalaz. Kod preostalih jedinki u grupi, analizom distribucije antigena virusa KKS, najveći broj pozitivnih i sumnjivih rezultata je utvrđen pregledom tkiva tonzila (5 prasadi), zatim slezine i mandibularnog limfnog čvora (3 praseta) dok je pozitivan nalaz u tkivu bubrega i terminalnog ileuma zabeležen u po jednom uzorku. Zavisno od primenjene metode ispitivanja i tehnike pripreme, mali deo tkiva se uzima kao uzorak za utvrđivanje virusa KKS u organu. Ukoliko je virus heterogeno distribuiran, inficirana jedinka može promaći uzorkovanjem pogrešnog dela tkiva. Virus je homogeno distribuiran u svežim uzorcima tonzila, slezini i limfnim čvorovima i uzorokovanjem dela ovih organa obezbeđuje se pouzdan nalaz. Distribucija virusa u bubrezima nije homogena i oni su manje pogodni za dijagnostiku (97).

Tonzile, nazalni i rektalni brisevi i nezgrušana krv su najpogodniji uzorci za brzu detekciju virusa KKS tehnikom RT-PCR (40). Tonzile predstavljaju primarno mesto replikacije ali i mesto perzistencije virusa, bez obzira na put infekcije (84). U kasnom periodu viremične faze virus zahvata parenhimatozne organe, pri čemu se viši titar virusa ustanovljava u limfnim tkivima (88). Virus može da perzistira u tonzilama nezavisno od toga da li jedinka ima specifična antitela ili ne (23). Smatra se da nivo kolostralnih antitela utiče na efikasnost vakcinacije i prevenciju replikacije virusa u tonzilama: vakcinacija u prisustvu niskih vrednosti kolostralnih antitela u potpunosti prevenira replikaciju virusa dok vakcinacija u prisustvu visokog titra kolostralnih antitela samo redukuje period umnožavanja virusa nakon veštačke infekcije (4).

Primenom tehnika antigen ELISA test i RT-PCR vršena je kontrola kinetike replikacije virusa u prisustvu specifičnih antitela. Ukoliko je virus vezan u kompleks sa specifičnim antitelima, može izostati pozitivan rezultat viremije (ELISA test), što je posledica pokrivanja i blokade virusne partikule antitelima protiv E2 i E<sup>ms</sup> (87). Postignuti rezultati ispitivanja potvrđuju rezultate Dewulf (2002) da RT-PCR predstavlja metodu koja prva ustanovljava viremiju. Međutim, pozitivan rezultat RT-PCR nije nedvosmisleno povezan sa prisustvom infektivne virusne partikule u uzorku zbog toga što se detektuje prisustvo specifičnog ciljnog regiona (40) (npr. antigen-

antitelo kompleks). Treba imati u vidu da je veza između antitela i antigena reverzibilna, tako da može doći do raskidanja i ponovnog vezivanja. Mehanizam koji bi bio odgovoran za oscilacije u detektabilnosti antigena virusa KKS u krvi treba sagledavati kompleksno, kao odraz balansiranja između imunološkog sistema organizma domaćina, replikacije virusa i imunosupresivnog delovanja virusa (25). Postignuti rezultati su zanimljivi sa aspekta korelacije između prisustva specifičnih antitela, antigena virusa odnosno virusne RNK u krvi i kliničkih simptoma bolesti.

Vakcinacijom prasadi poreklom od krmača višekratno vakcinisanih K-sojem virusa, subjediničnom vakcinom postignut je solidan aktivni imunološki odgovor u smislu sinteze specifičnih antitela. U poređenju sa rezultatima ispitivanja vakcinacijom sa K-sojem, interferencija nije utvrđena odnosno značajno je manje izražena, ali svakako da zaštitni efekat subjedinične vakcine zavisi i od nivoa kolostralnih antitela. Pored toga, može se istaći da u nijednoj od eksperimentalnih grupa vakcinisanih subjediničnom vakcinom nije utvrđena KKS kod neimune prasadi u direktnom kontaktu (sprečavanje pojave sekundarnih žarišta oboljenja). Utvrđene razlike se mogu objasniti različitom prirodom subjedinične (inaktivisana) i vakcine sa K-sojem virusa KKS (atenuisana) (55). Slična eksperimentalna ispitivanja efikasnosti subjedinične vakcine kod zalučene prasadi poreklom od krmača vakcinisanih atenuisanom vakcinom su vršena na Tajlandu. Kod dvokratno vakcinisane prasadi subjediničnom vakcinom, utvrđena je blaga febra i inapetencija sve do 6 dpi. Virus KKS je izolovan iz krvi ali ne iz organa vakcinisane inficirane prasadi. Smatra se da su imunitet krmača i nivo pasivnog imuniteta na dan vakcinacije prasadi faktori uspešne vakcinacije protiv KKS. Neophodne su dve aplikacije subjedinične vakcine za kliničku zaštitu prasadi sa niskim vrednostima kolostralnih antitela ali je i pored toga kod većine utvrđena febra i viremija nakon veštačke infekcije (13).

Mišljenje da su životinje (vremenski gledano) viremične najmanje onoliko dugo koliko i pokazuju kliničke znakove oboljenja (61) se ne može prihvatiti i za prasad sa različitim nivoom kolostralnih antitela. Kod preživelih prasadi virus KKS se umnožavao u organizmu bez pokazivanja izraženih kliničkih simptoma. S obzirom na to da su prasad vakcinisana K sojem istog uzrasta, nutritivnog statusa, sa farme koja kontinuirano sprovodi propisan program imunoprofilakse protiv KKS, proizilazi da je ishod infekcije bio vezan za individualne karakteristike imunološkog statusa jedinki.

Kleiboeker (2002) smatra da u slučaju kada KKS izbije u vakcinisanom zapatu svinja, oboljenje ima karakteristike hroničnog toka sa nekarakterističnom kliničkom slikom, i često se pogrešno označava kao atipična KKS. U organizmu prasadi sa kolostralnim antitelima nakon vakcinacije i infekcije, virus KKS može da se umnožava i izlučuje bez pokazivanja izraženih kliničkih simptoma (88).

U **kontrolnoj grupi prasadi** već 2 i 3 dpi je zabeležen porast telesnih temperatura i klinički znaci oboljenja KKS kod svih jedinki (inapetencija, letargija, konjunktivitis, opstipacija). U kliničkoj slici su dominirali znaci posteriorne pareze, praćene konvulzijama, afonijom i iscrpljujućom dijarejom do uginuća (10, 12 odnosno 14 dpi). Kod svih jedinki je utvrđena viremija (ELISA test) od 3 dpi kontinuirano do uginuća (tabela br. 5). Ovaj nalaz potvrđuje da su determinante virusa: infektivna doza (88), virulentnost i patogenost soja (11) primenjenog za veštačku infekciju predstavljale odlučujući faktor za tok i ishod oboljenja u kontrolnoj grupi i da su faktori vezani za organizam domaćina od malog značaja na ishod infekcije sa visoko virulentnim virusom (84). U kontrolnoj grupi prasadi, patomorfološki nalaz je kod svih jedinki bio karakterističan za akutni tok KKS (hemoragični limfadenitis, difteroidno-nekrotični tonzilitis, hemoragični infarkti na slezini, petehijalna krvarenja na bubrezima i sluznici mokraćne bešike, tačkasta krvarenja po sluznici žučne kese i sluznici rektuma). U organima i tkivima prasadi kontrolne grupa ELISA testom je utvrđen antigen virusa KKS u svim ispitanim uzorcima slezine, bubrega, mandibularnih limfnih čvorova, tonzila i terminalnog ileuma. Nalaz u kontrolnoj grupi prasadi je u saglasnosti sa rezultatima Prodanov et al. (2007).

Kako je ranije navedeno, veštačka infekcije je izvršena i/m inokulacijom virusa KKS, što svakako ne predstavlja prirodni način infekcije. Zbog toga je moguće da je period do prvog ustanovljavanja viremije bio kraći nego što je to slučaj sa prirodnim načinom (oronazalni) infekcije. Za primenjeni soj virusa KKS nisu izvršena ispitivanja da li različiti putevi inokulacije utiču na vreme prve pojave viremije. Međutim, smatra se da na širenje virusa KKS u organizmu ne utiče put infekcije (oronazalni, subkutani ili intramuskularni), virus se uskoro nakon infekcije nalazi u tonzilama (84) i uticaj puta inokulacije na vreme prve pojave viremije od manjeg je značaja nego infektivna doza

(49). Kontaktna infekcija je bila oronazalna, ali se ne može odrediti doza virusa kojoj su kontaktno inficirane životinje bile izložene.

Eksperimentalnim ispitivanjem utvrđen je imunogeni efekat dve različite vakcine u heterogenoj populaciji prasadi sa aspekta kolostralne zaštite, koja se i sreće u terenskim uslovima na farmama svinja u Srbiji. Vakcinacija u prisustvu kolostralnih antitela rezultira u varijabilnom imunološkom statusu prasadi, zavisno od koncentracije pasivnih antitela u vreme vakcinacije. Smatra se da je u cilju uspešne vakcinacije prasadi poreklom od vakcinisanih krmača neophodno poznavanje titra kolostralnih antitela protiv virusa KKS, jer je njihova koncentracija u vreme vakcinacije odlučujući faktor koji određuje budući imuni status prasadi (81). Kontrola prisustva virusa u krvi i brisevima predstavlja način utvrđivanja replikacije virusa u organizmu i njegovog izlučivanja (24).

U kontroli KKS, ključno je ustanovljavanje inaparentno inficiranih životinja (klinički zdrave kliconoše) koje inficiraju prijemčive jedinice u kohabitaciji. Zbog toga što vakcinacija može maskirati kliničke znake oboljenja bez prevencije nastanka infekcije, vakcinisani zapati predstavljaju rizik za širenje KKS. U enzootski inficiranim vakcinisanim zapatima, zbog prisustva slabo virulentnih sojeva virusa, infekcija se ne zapaža dok se ne prekine vakcinacija. Zbog toga, kako opada prevalenca KKS, treba predvideti prestanak vakcinacije i depopulaciju inficiranih zapata (63). U takvim uslovima, kontrola imuniteta predstavlja kritični faktor kontrole i eradikacije KKS (62).

## 7. ZAKLJUČCI

---

Na osnovu postignutih rezultata istraživanja, mogu se izneti sledeći zaključci:

1. Ispitivanjem uzoraka krvnih seruma prasadi starih 43 dana, poreklom od krmača vakcinisanih K-sojem virusa KKS na prisustvo kolostralnih antitela ELISA testom, kod 44% ispitanih jedinki utvrđeno je prisustvo maternalnih antitela, dok je kod više od polovine prasadi utvrđen negativan nalaz ili prisustvo kolostralnih antitela, na granici detekcije.
2. Na osnovu dobijenih rezultata seroloških ispitivanja prasadi koja su 45. dana života vakcinisana K-sojem virusa KKS, utvrđeno je da kolostralna antitela suprimiraju imunološki odgovor na vakcinalni antigen i da je u slučajevima kada je ustanovljen viši nivo maternalnih antitela u krvnom serumu prasadi pre vakcinacije, supresija razvoja aktivnog imuniteta bila izraženija.
3. Vakcinacijom prasadi poreklom od krmača višekratno vakcinisanih K-sojem virusa, primenom subjedinične vakcine u uzrastu od 45 (prva doza) i 73 (druga doza) dana, postignut je solidan aktivni imunski odgovor u smislu sinteze specifičnih antitela.
4. Primenom antigen ELISA testa kao i RT-PCR tehnikom, kod prasadi vakcinisanih atenuisanom i subjediničnom vakcinom, posle veštačke infekcije ustanovljena je replikacija i izlučivanje virusa, bez izraženih kliničkih simptoma bolesti (latentna infekcija).
5. Prasad vakcinisana K-sojem virusa KKS, posle veštačke infekcije virulentnim sojem, izlučuju i prenose virus KKS na seronegativne tj. nevakcinisane životinje u kohabitaciji.
6. Prasad vakcinisana subjediničnom vakcinom, posle veštačke infekcije izlučivala su virus, ali se nije odigrala veštačka infekcija seronegativnih odnosno nevakcinisanih životinja u kohabitaciji.



7. Imajući u vidu da je u grupi prasadi vakcinisanih subjediničnom vakcinom, kontrolom oronazalnih i rektalnih briseva utvrđen genom virusa KKS (RT-PCR), kontaminisanje okoline virusom i horizontalno prenošenje infekcije u terenskim uslovima ipak ne može da se isključi.

8. Primenom postojećih programa vakcinacije K-sojem virusa, supklinički inficirane životinje (kliconoše), mogu da budu prisutne u populaciji i da doprinesu širenju KKS.

9. Dobijeni rezultati uticaja kolostralnih antitela na stepen imunosti prasadi vakcinisanih protiv klasične kuge svinja ukazuju da i subjedinične vakcine mogu da imaju potencijalnu primenu u programu kontrole KKS u regionima u kojima se oboljenje javlja enzootski.

## 8. LITERATURA

---

1. Artois M. et al. (2002): Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 21(2): 287-303.
2. Backer J. A. et al. (2009): Modelling the effectiveness and risks of vaccination strategies to control classical swine fever epidemics. *J R Soc Interface* 6 (39): 849-61.
3. Beer M. et al. (2007): Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 25: 5665-5670.
4. Biront P. and Leunen J. (1988): Vaccines. In: Liess (ed.), *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Ch. 9, pp.181-200.
5. Blome S. et al. (2006): Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 25(3):1025-1038.
6. Blome S., Grotha I., Moenning V., Greiser-Wilke (2010): Classical swine fever virus in South-Eastern Europe-Retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol* 146: 276-284.
7. Blome S. et al. (2011): Genetic differentiation of infected from vaccinated animals after implementation of an emergency vaccination strategy against classical swine fever in wild boar. *Vet Microbiol* 153(3-4): 373-6.
8. Bronsvort B. M., Alban L., Greiner M. (2008): Quantitative assessment of the likelihood of the introduction of classical swine fever virus into Danish swine population. *Preventive Veterinary Medicine* 85 (3-4): 226-240.
9. Chen N. et al. (2010): Antigenic analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein using pig antibodies identifies residues contributing to antigenic variation of the vaccine C-strain and group 2 strains circulating in China. *Virology Journal* 7:378.
10. Coggins L. (1964): Study of Hog Cholera Colostral Antibody and Its Effect on Active Hog Cholera Immunization. *Am. J. Vet. Res.* 25: 613 - 617.
11. Dahle J. and Liess B. (1992): A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* Vol. 15, No. 3, 203 - 211.
12. Damrongwatanapokin S. et al. (2006a): Efficacy of classical swine fever E2 subunit vaccine in vaccinated maternal-derived antibody positive pigs. *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Vol. 2, p. 119.*

13. Damrongwatanapokin T. et al. (2006b): The efficacy of classical swine fever E2 subunit vaccine under field trial in Thailand. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Vol. 2, p.120.
14. De Smit A. J. (2000): Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review. *Vet Quart* 22: 182-8.
15. De Smit A. J. et al. (2001): Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. *Vet Microbiol* 78: 307-317.
16. de Vos C. J. et al. (2003): The risk of the introduction of classical swine fever virus at regional level in the European Union: a conceptual framework. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 22 (3): 795-810.
17. Depner K. R. et al. (1996): Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a virus isolated during the 1995 epidemic in Germany: Clinical, virological, serological and pathological findings. *European Journal of Veterinary Pathology*, Vol 2, No. 2, 61-66.
18. Depner K. R. et al. (2000): Transient classical swine fever virus infection in wild boars piglets partially protected by maternal antibodies. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 107, 66 - 68.
19. Depner K. R. et al. (2001): Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Vet Microbiol* 83: 107-120.
20. Depner K., Hoffmann B., Beer M. (2007): Evaluation of real-time RT-PCR assay for the routine intra vitam diagnosis of classical swine fever. *Vet Microbiol* 121: 338-343.
21. Dewulf J. et al. (2001a): An experimental infection with classical swine fever virus in pregnant sows: transmission of the virus, course of the disease, antibody response, and effect on gestation. *Journal of Veterinary Medicine B*, 48: 583-591.
22. Dewulf J. et al. (2001b): Evaluation of the potential of dogs, cats and rats to spread classical swine fever virus. *Veterinary Record* 149: 212-213.
23. Dewulf J. (2002): A comparative study for emergency vaccination against classical swine fever with an E2 sub-unit marker vaccine and C-strain vaccine. In: *Epidemiology and control of classical swine fever: experimental assessment of virus transmission and potential benefits of emergency vaccination*. Ch. 4.4, p.159-180.

24. Dewulf J. et al. (2002): An E2 sub-unit vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine* 20: 86-91.
25. Dewulf J. et al. (2004a): Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *Journal of Virological Methods* 119: 137-143.
26. Dewulf J. et al. (2004b): Efficacy of E2-sub-unit marker and C-strain vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus in weaner pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 65: 121-133.
27. Dewulf J. et al. (2005): Evaluation of the epidemiological importance of classical swine fever infected, E2 sub-unit marker vaccinated animals with RT-nPCR positive blood samples. *J. Vet. Med.* B52, 367-371.
28. Dong X-N., Chen Y-H. (2007): Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 25: 205-230.
29. Edwards S. (2000): Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 73: 175 – 181.
30. Edwards S. et al. (2000): Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* 73: 103-119.
31. Elbers A. R. W. et al. (2004): Ability of veterinary pathologists to diagnose classical swine fever from clinical signs and gross pathological findings. *Preventive Veterinary Medicine* 66: 239-246.
32. Floegel-Niesmann G. (2003): Marker Vaccines and Companion Diagnostic Tests for Classical Swine Fever. *Dev Biol. Basel, Karger* 114: 185-191.
33. Floegel-Niesmann G. et al. (2009): Virulence of Classical Swine Fever virus isolates from Europe and other areas during 1996 until 2007. *Vet Microbiol* 139: 165-169.
34. Flores-Gutiérrez G. H. and Infante F. (2008): Resolution of a Classical Swine Fever Outbreak in the United States-Mexico Border Region. *Transboundary and Emerging Diseases* 55: 377-381.
35. Frías-Lepoureau M. T. and Grieser-Wilke I. (2002): An Update on Classical Swine Fever Virus Molecular Epidemiology. In: *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Ed. Morilla A., Yoon K.-J., Zimmerman J.J., Blackwell Publishing Company, Iowa State Press, Section 5, Ch.5.5., pp. 165-171.

36. Fritzscheier J. et al. (2000): Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol* 77: 29-41.
37. Gómez-Villamandos J. C. et al. (2006): Neuropathologic Study of Experimental Classical Swine Fever. *Vet Pathol* 43: 530-540.
38. Greiser-Wilke I. and Moennig V. (2004): Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Animal Health Research Reviews* 5(2): 223-226.
39. Greiser-Wilke I., Blome S., Moennig V. (2007): Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus-Status quo and new developments. *Vaccine* 25:5524-5530.
40. Hoffmann B. et al. (2005): Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods* 130: 36-44.
41. Kaden V. et al. (2000): Classical swine fever virus: clinical, virological, serological and hematological findings after infection of domestic pigs and wild boars with the field isolate "Spante" originating from wild boar. *Berl. Münch.Tierärztl. Wschr.* 113: 412-416.
42. Kaden V. et al. (2003): Role of birds in transmission of classical swine fever virus. *J. Vet. Med. B* 50: 357-359.
43. Kaden V. et al. (2007): Value of skin punch biopsies for the diagnosis of acute classical swine fever. *J Vet Diagn Invest* 19: 697-701.
44. Kaden V. et al. (2010): An update on safety studies on the attenuated „RIEMSER<sup>®</sup> Schweinepestoralvakzine“ for vaccination of wild boar against classical swine fever. *Vet Microbiol* 143: 133-138
45. Kleiboeker S. B. (2002): Swine fever: Classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin Food Anim* 18, 431 - 451.
46. Klinkenberg D. et al. (2002): Influence of maternal antibodies on efficacy of a subunit vaccine: transmission of classical swine fever virus between pigs vaccinated at 2 weeks of age. *Vaccine* 20: 3005-3013.
47. Koenig P. et al. (2007): Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissues samples of pigs vaccinated either with a conventional c-strain vaccine or a modified live marker vaccine. *Vet Microbiol* 120: 343-351.

48. Kotekaas J. et al. (2011): Protective efficacy of a Classical swine fever virus C-strain deletion mutant and ability to differentiate infected from vaccinated animals. *Vet Microbiol* 147: 11-18.
49. Laevens H. et al. (1998): An experimental infection with classical swine fever virus in weaner pigs. I. Transmission of the virus, course of the disease and antibody response. *Vet Quart* 20: 41 - 5.
50. Lai S. S. et al. (1980): Immune response of pigs with different levels of colostral antibody to inoculation with LPC-Chinese strain of hog cholera vaccine. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 6: 77-81.
51. Lai S. S., Ho W. C. and Tsao S. H. (1986): Absorption of colostral antibodies and neonatal vaccination against hog cholera. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 12: 117 - 123.
52. Lai S. S., Lai L. Y, Ho W. C. (1989): Changes of antibody levels in sows influenced by pregnancy. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 15: 327-333.
53. Launais M., Aynaud J. M., Corthier G. (1978): Hog cholera virus: active immunization of piglets with Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet Microbiol* 3: 31-43.
54. Leifer I. et al. (2009): Differentiation of C- strain "Riems" or CP7\_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 158: 114-122.
55. Lipowski A., Drexler C., Pejsak Z. (2000): Safety and efficacy of classical swine fever subunit vaccine in pregnant sows and their offspring. *Vet Microbiol* 77: 99-108.
56. Liu L. et al. (2009): Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385 (2): 351-357.
57. Martens M., Rosales C., Morilla A. (2003): Evaluation of the use of a subunit classical swine fever marker vaccine under field conditions in Mexico. *J swine Health Prod.* 11 (2): 81-85.
58. Martens M.R.T. et al. (2006): Field-experiences with subunit vaccine against classical swine fever in Mexico and the Dominican Republic. *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Vol. 1, p.226.*
59. Mendosa S. et al. (2007): Antigenic differentiation of classical swine fever vaccinal strain PAV-250 from other strains, including field strains from Mexico. *Vaccine* 25: 7120-7124.

60. Mittelholzer C. et al. (2000): Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet Microbiol* 74: 293-308.
61. Moennig V. (2000): Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol* 73: 93-102.
62. Moennig V., Floegel-Niesmann G. and Greiser-Wilke I. (2003): Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A Review of New Knowledge. *Vet J.* 165: 11-20.
63. Morilla A. and Carvajal M. A. (2002): Experiences with Classical Swine Fever Vaccination in Mexico. In: *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Ed. Morilla A., Yoon K.-J., Zimmerman J.J., Blackwell Publishing Company, Iowa State Press, Section 5, Ch.5.4., pp. 159-164.
64. Moulin H. R. et al. (2007): Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* 365: 376-389.
65. Ooi P. T. et al. (2008): Vaccination of sows during gestation with a modified live classical swine fever vaccine. *Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa*, vol. 1, p. 83.
66. Paton D. J., Greiser-Wilke I. (2003): Classical swine fever-an update. *Research in Veterinary Science* 75: 169-178.
67. Penrith M. L., Vosloo W. and Mather C. (2011): Classical Swine Fever (Hog Cholera): Review of Aspects Relevant to Control. *Transboundary and Emerging Diseases* 58:187-196.
68. Pescovitz, M. D. (1998): Immunology of the Pig. In: Pastoret, P. - P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds.), *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 373 - 420.
69. Precaustra P., Kato F., Brun A. (1983): Swine fever. Immunisation of piglets. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* Vol. 6, No. 4, pp. 281 - 289.
70. Prodanov J. et al. (2007): Passive immunity evaluation in piglets originating from sows vaccinated with China strain of classical swine fever virus. *Acta Veterinaria* Vol. 57, No. 5-6, p. 413-427.

71. Quezada M. et al. (2000): Characterization of Lesions Caused by a South American Virulent Isolate (“Quillota”) of the Hog Cholera Virus. *J. Vet. Med. B Infect Dis Vet Public Health* 47 (6): 411-422.
72. Ribbens S. et al. (2004): Transmission of classical swine fever. A review. *Vet. Q.* 26: 146-155.
73. Ribbens S. et al. (2007): Evidence of indirect transmission of classical swine fever virus through contacts with people. *Vet. Rec.* 160 (20): 687-90.
74. Rooke J. A. et al. (2003): Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglet and plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning. *Livestock Production Science* 81: 223-234.
75. Sánchez-Cordón P. J. et al. (2006): The Role of B Cells in the Immune Response to Pestivirus (Classical Swine Fever Virus). *J. Comp. Path.* Vol. 135: 32-41.
76. Soós P. et al. (2001): Evaluation of vaccine-induced maternal immunity against classical swine fever. *Acta Veterinaria Hungarica* 49 (1), pp. 17 - 24.
77. Suradhat S., Damrongwatanapokin S. (2003): The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet Microbiol* 92: 187-194.
78. Suradhat S., Damrongwatanapokin S., Thanawongnuwech R. (2007): Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol* 119: 1-9.
79. Teifke J. P. et al. (2005): Nictitating membrane as a potentially useful postmortem diagnostic specimen for classical swine fever. *J Vet Diagn Invest* 17: 341-345.
80. Terán M. V., Ferrat N. C., and Lubroth J. (2004): Situation of Classical Swine Fever and the Epidemiologic and Ecologic Aspects Affecting Its Distribution in the American Continent. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026: 54-64.
81. Terpstra C. and Wensvoort G. (1988): The Protective Value of Vaccine-Induced Neutralising Antibody Titres in Swine Fever. *Vet Microbiol* 16: 123 - 128.
82. Terpstra C. and de Smit A. J. (2000): The 1997/1998 epizootic of swine fever in the Netherlands: control strategies under a non-vaccination regimen. *Vet Microbiol* 77: 3-15.



83. Terzić S. et al. (2003): Comparison of Antibody Values in Sera of Pigs Vaccinated with a Subunit or an Attenuated Vaccine against Classical Swine Fever. *Veterinary Research Communications* 27: 329-339
84. Trautwein G. (1988): Pathology and pathogenesis of the disease. In *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Editors: Liess, B. Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 27 - 49.
85. Turner C., Williams S. M., Cumby T. R. (2000): The inactivation of foot and mouth disease, Aujeszky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. *J. Appl. Microbiol.* 89: 760-767.
86. Uttenthal A. et al. (2001): Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet Microbiol* 83: 85-106.
87. Uttenthal A. et al. (2003): Experimental infection with Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old-pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. *Vet Microbiol* 92, 197-212.
88. van Oirschot J.T. and Terpstra C. (1989): Hog Cholera Virus. In *Virus infections of porcines*. M. B. Pensaert, ed.; New York, Elsevier Science Publishers, pp. 113 - 130.
89. van Oirschot J.T. (2003): Vaccinology of swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96: 367 – 384.
90. Vandeputte J. and Chappuis G. (1999): Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 18 (3): 638 - 647.
91. Vandeputte J. et al. (2001): Adsorption of colostral antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs. *AJVR*, Vol 62, No. 11, pp. 1805 - 1811.
92. Vannier P. et al. (2007): Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 26 (2): 351-372.
93. Weesendorp E. et al. (2008a): Detection and quantification of classical swine fever virus in air samples originating from infected pigs and experimentally produced aerosols. *Vet Microbiol* 127: 50-62.
94. Weesendorp E., Stegeman A., Loeffen W. (2008b): Survival of classical swine fever virus at various temperatures in faeces and urine derived from experimentally infected piglets. *Vet Microbiol* 132: 249-259.

95. Weesendorp E., Stegeman A., Loeffen W. (2009a): Dynamics of virus excretion via different routes in pigs experimentally infected with classical swine fever virus strains of high, moderate or low virulence. *Vet Microbiol* 133: 9-22.
96. Weesendorp E., Stegeman A., Loeffen W. (2009b): Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs infected with strains of high, moderate or low virulence. *Vet. Microbiol* 135 (3-4): 222-30.
97. Weesendorp E., Willems E. M., Loeffen W. (2010): The effect of tissue degradation on detection of infectious virus and viral RNA to diagnose classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 141: 275-281.
98. Weesendorp E. et al. (2011): Time-dependent infection probability of classical swine fever via excretions and secretions. *Preventive Veterinary Medicine* 98: 152-164.
99. Zhao J.- J. et al. (2008): Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 126: 1-10.
100. Ziegler U. and Kaden V. (2002): Vaccination of weaner pigs against classical swine fever with subunit vaccine "Porcilis Pesti" influence on different immunisation pattern on excretion and transmission of challenge virus. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 115: 267-273. (Article in Germany, summary in English)

## 9. PRILOG

### 9.1. Tabele sa prikazom patomorfoloških promena

**Tabela br. 10** Prikaz patomorfoloških promena u I - pozitivnoj K grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	1	2	3	4	5	6	7	S1	S2
Erythema cutis diffusa		-	-	-	-	-	-	-	++	+
Haemorrhagiae cutis diffusa		++	-	-	-	-	-	-	+++	++
Necrosis cutis		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Icterus		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Haemorrhagiae conjunctivae		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Stomatitis et glossitis necroticans		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Haemorrhagiae linguae		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Tonsillitis lacunaris		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Tonsillitis diphtheroides necroticans		++	-	-	-	-	-	-	-	++
Haemorrhagiae mucosae epiglottidis		-	-	++	++	++	++	++	-	++
Lymphadenitis simplex acuta		+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphadenitis haemorrhagica acuta		-	-	-	-	-	-	-	++	+++
Haematoma musculi sceleti		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Haemorrhagiae lienis subcapsularis		-	-	-	-	++	-	-	++	++
Infarctus haemorrhagicus lienis		+++	++	-	-	++	-	-	-	-
Petechiae et ecchymoses corticis renis		+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemorrhagiae mucosae pelvis renalis		-	-	-	-	-	-	-	++	+++
Petechiae mucosae vesicae urinariae		-	++	-	-	++	-	++	++	-
Pericarditis fibrinosa		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Petechiae subepicardii		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Petechiae et ecchymoses pulmonum		-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Pneumonia fibrinosa in statu hepatisationis rubrae et griseae		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Petechiae pleure costalis		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Perihepatitis focalis		-	-	-	-	-	-	-	+	-
Haemorrhagiae subserosae ventriculi		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Petechiae tunicae mucosae ventriculi		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Gastritis haemorrhagica		+++	-	-	-	-	-	-	-	++
Gastritis diptheroides circumscripta		-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Petechiae tunicae mucosae intestini		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Petechiae subserosae intestini		++	-	-	-	-	-	-	-	++
Petechiae tunicae mucosae caeci		++	-	-	-	-	-	-	++	++
Petechiae tunicae mucosae coli		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Petechiae subserosae colonis		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Hyperemiae tunicae mucosae coli		++	-	-	-	-	++	-	-	-
Colitis diptheroides necrotica diffusa et follicularis		-	-	-	-	-	-	-	++	+++
Haemorrhagiae mucosae recti		+++	-	-	-	-	-	-	+++	++
Congestio cerebri		-	-	-	-	-	-	-	++	++

- nije ustanovljeno; + slabo izraženo; ++ izraženost srednjeg stepena; +++ izrazito

**Tabela br. 11** Prikaz patomorfoloških promena u III - sumnjivoj K grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	15	16	17	18	19	20	21	S5	S6
Haemorrhagiae cutis diffusa		-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Necrosis cutis		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Conjunctivitis diphtheroides		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Stomatitis et glossitis necroticans		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Tonsillitis diphtheroides necroticans		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Haemorrhagiae mucosae epiglottidis		-	++	-	-	-	++	-	+++	-
Lymphadenitis haemorrhagica acuta		-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
Haematoma musculi sceleti		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Haemorrhagiae lienis subcapsularis		++	-	-	-	-	-	-	++	++
Infarctus haemorrhagicus lienis		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Petechiae et ecchymoses corticis renis		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Haemorrhagiae mucosae pelvis renalis		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Petechiae mucosae vesicae urinariae		++	++	-	++	-	++	++	+++	+++
Dilatatio vesicae urinariae porcelli		-	++	++	-	-	-	-	-	-
Peritonitis serofibrinosa		-	-	-	-	-	-	++	-	-
Hydropericardium		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Haemothorax		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Petechiae subepicardii		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Petechiae subendocardi		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Petechiae et ecchymoses pulmonum		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Pneumonia fibrinosa in statu hepatisationis rubrae et griseae		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Pneumonia fibrinosa partim necroticans lobulorum cranialium		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Petechiae pleure costalis		-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Haemorrhagiae hepatis		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Perihepatitis focalis		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Petechiae mucosae cholecistae		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Gastritis catharralis acuta		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Haemorrhagiae tunicae mucosae ventriculi		-	-	-	-	-	++	-	+++	-
Gastritis pseudomembranaceae		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Petechiae tunicae mucosae intestini		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Petechiae subserosae intestini		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Hyperemiae mucosae caeci		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Hyperemiae mucosae coli		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Petechiae tunicae mucosae coli		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Hyperemiae mucosae recti		-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Haemorrhagiae mucosae recti		-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Congestio cerebialis		-	-	-	-	-	-	-	++	+++

- nije ustanovljeno; + slabo izraženo; ++ izraženost srednjeg stepena; +++ izrazito

**Tabela br. 12** Prikaz patomorfoloških promena u I - pozitivnoj E2 grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	22	23	24	25	26	27	28	S7	S8
Erythema cutis diffusa		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Tonsillitis lacunaris		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Petechiae mucosae epiglottidis et pharyngis		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Lymphadenitis haemorrhagica acuta		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Haematoma musculi sceleti		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Haemorrhagiae lienis subcapsularis		-	-	-	-	++	-	-	-	-
Splenomegalia		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Haemorrhagiae hepatis		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Petechiae et ecchymoses corticis renis		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Renomegalia		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Dilatatio vesicae urinariae porcelli		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Petechiae mucosae vesicae urinariae		++	-	-	++	-	-	-	-	-
Pneumonia interstitialis		-	-	++	-	-	-	-	-	-
Petechiae et ecchymoses pulmonum		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Pneumonia fibrinosa in statu hepatisationes rubrae et griseae		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Pleuritis adhesiva circumscripta		++	++	-	-	-	++	-	-	-
Pneumonia suppurativa		-	-	++	-	-	-	-	-	-
Petechiae subepicardii		-	-	++	-	-	++	-	-	-
Petechiae subserosae ventriculi		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Gastritis haemorrhagica		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Petechiae tunicae serosae coli		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Haemorrhagiae mucosae recti		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Congestio cerebri		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Haemorrhagiae cerebri et cerebelli		-	-	-	-	-	++	-	-	-

**Tabela br.13** Prikaz patomorfoloških promena u III - sumnjivoj E2 grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	36	37	38	39	40	41	42	S11	S12
Tonsillitis diphtheroides necroticans		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphadenitis simplex acuta		+	-	-	-	++	-	-	-	-
Petechiae et ecchymoses corticis renis		+	-	-	-	-	-	-	-	-
Infarctus ishemici renis		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Nephritis interstitialis disseminata		-	++	-	-	-	-	-	-	-
Pericarditis serofibrinosa		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Pneumonia enzootica suum		+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastritis haemorrhagica		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Petechiae tunicae mucoosae intestini		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Petechiae tunicae mucosae caeci		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Proctitis diphtheroides		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Congestio cerebri		++	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemorrhagiae cerebri et cerebelli		+	-	-	-	-	-	-	-	-

- nije ustanovljeno; + slabo izraženo; ++ izraženost srednjeg stepena; +++ izrazito

**Tabela br. 14** Prikaz patomorfoloških promena u II - negativnoj E2 grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	29	30	31	32	33	34	35	S9	S10
Lymphadenitis simplex acuta		++	-	-	-	-	++	-	-	-
Infarctus ischemici renis		-	-	-	-	-	-	++	-	-
Petechiae mucosae vesicae urinariae		++		-	-	-	+	++	-	-
Pleuropneumonia actinobacillosa		-	-	-	-	++	++	-	-	-
Emphysema pulmonis		-	-	-	-	++	-	-	-	-

**Tabela br. 15** Prikaz patomorfoloških promena u kontrolnoj grupi prasadi

Patomorfološke promene	Broj praseta	K1	K 2	K3	K4	K5	K6
Haemorrhagiae et erythema cutis diffusa		+++	+++	++	++	++	++
Necrosis cutis		++	++	-	-	-	+
Icterus		-	+	-	-	-	+
Haemorrhagiae subcutaneae		++	-	+	+	+	++
Haemorrhagiae linguae		+	++	-	-	-	+
Tonsillitis diphtheroides necroticans		+++	+++	+	++	++	++
Pharyngitis et laryngitis diphtheroides		+	++	-	++	-	++
Haemorrhagiae mucosae epiglottidis		+++	+++	++	++	++	+++
Haemorrhagiae mucosae pharyngis		++	++	-	++	+	++
Lymphadenitis haemorrhagica acuta		+++	+++	++	++	++	+++
Infarctus haemorrhagicus lienis		-	+++	+	++	-	++
Petechiae et ecchymoses corticis renis		+++	+++	++	+++	++	+++
Haemorrhagiae mucosae pelvis renalis		++	+++	+	++	-	++
Petechiae mucosae vesicae urinariae		+++	+++	++	++	+	++
Petechiae subepicardii		++	++	+	+	-	++
Petechiae subendocardii		++	+	+	+	-	++
Ecchymosis pulmonis		+	++	++	+	-	++
Pneumonia fibrinosa in statu hepatisationis rubrae et griseae		+++	++	++	-	++	-
Haemorrhagiae hepatis		-	+	-	+	+	-
Petechiae et ecchymoses cholecistae		-	++	-	+	++	-
Haemorrhagiae mesenterii		++	+++	+	++	++	-
Haemorrhagiae subserosae ventriculi		++	-	+	++	-	-
Gastritis haemorrhagica		-	-	+	+++	-	+++
Gastritis diphtheroides circumscripta		+++	+++	-	-	++	-
Petechiae tunicae mucosae intestini		+++	++	+	++	+	+
Petechiae subserosae intestini		++	+	+	++	++	+
Petechiae tunicae mucosae caeci		+++	++	+	++	++	+++
Typhlitis diphtheroidea necroticans		+++	+++	-	-	++	+
Petechiae tunicae mucosae coli		++	++	++	++	++	+
Petechiae subserosae colonis		-	-	+	+	-	-
Colitis diphtheroides diffusa et follicularis		+++	+++	-	+	++	+
Haemorrhagiae mucosae recti		++	+++	++	++	++	+++
Haemorrhagiae cerebri et cerebelli		+++	+	+	++	+	++

- nije ustanovljeno; + slabo izraženo; ++ izraženost srednjeg stepena; +++ izrazito

## 9.2. Foto - dokumentacija



Slika 1. I-pozitivna K grupa, prase br. 1: pareza zadnjih ekstremiteta



Slika 2. I-pozitivna- K grupa, prasad br. S1 i S2: pareza i paraliza zadnjih ekstremiteta



**Slika 3.** III-sumnjiva-K grupa, prasead br.19 i 20: inapetencija, letargija i konjunktivitis



**Slika 4.** III-sumnjiva- K grupa, prase br. 20: izražen otok očnih kapaka





**Slika 5.** I-pozitivna-K grupa, uginulo prase br. 1: krvarenja po koži ušnih školjki i rila



**Slika 6.** Difteroidno-nekrotični tonzilitis



**Slika 7.** Hemoragični infarkti na slezini



**Slika 8.** Petehijalna krvarenja na bubrežima



**Slika 9.** Tačkasta krvarenja u bubrežnoj karlici



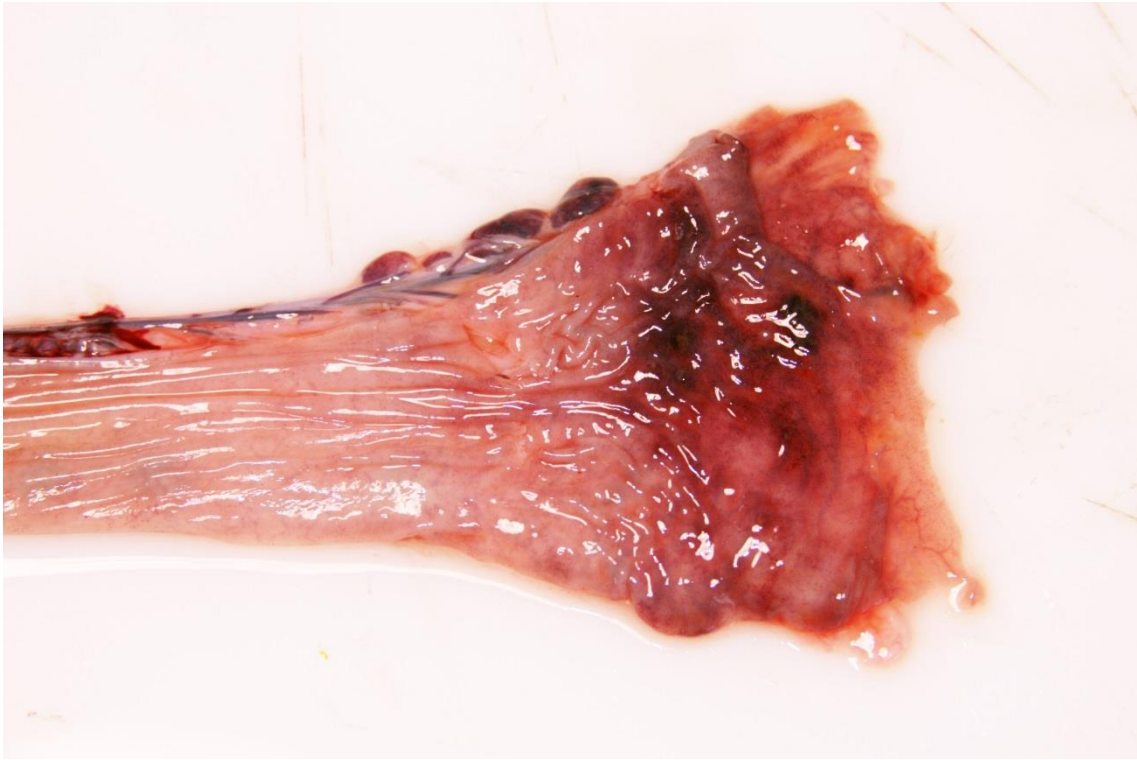
**Slika 10.** Tačkasta krvarenja po sluznici mokraćne bešike



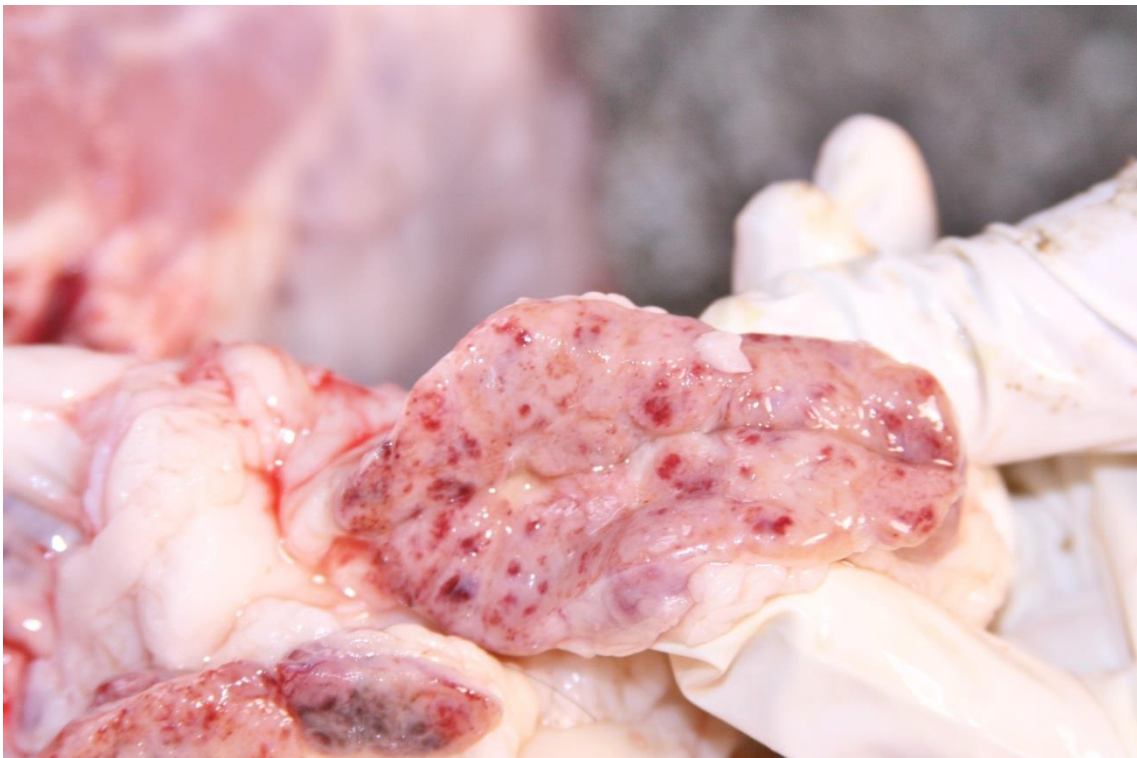
**Slika 11.** Tačkasta krvarenja po sluznici epiglotisa



**Slika 12.** Krvarenja u perirektalnim limfnim čvorovima



**Slika 13.** Krvarenja po sluznici rektuma



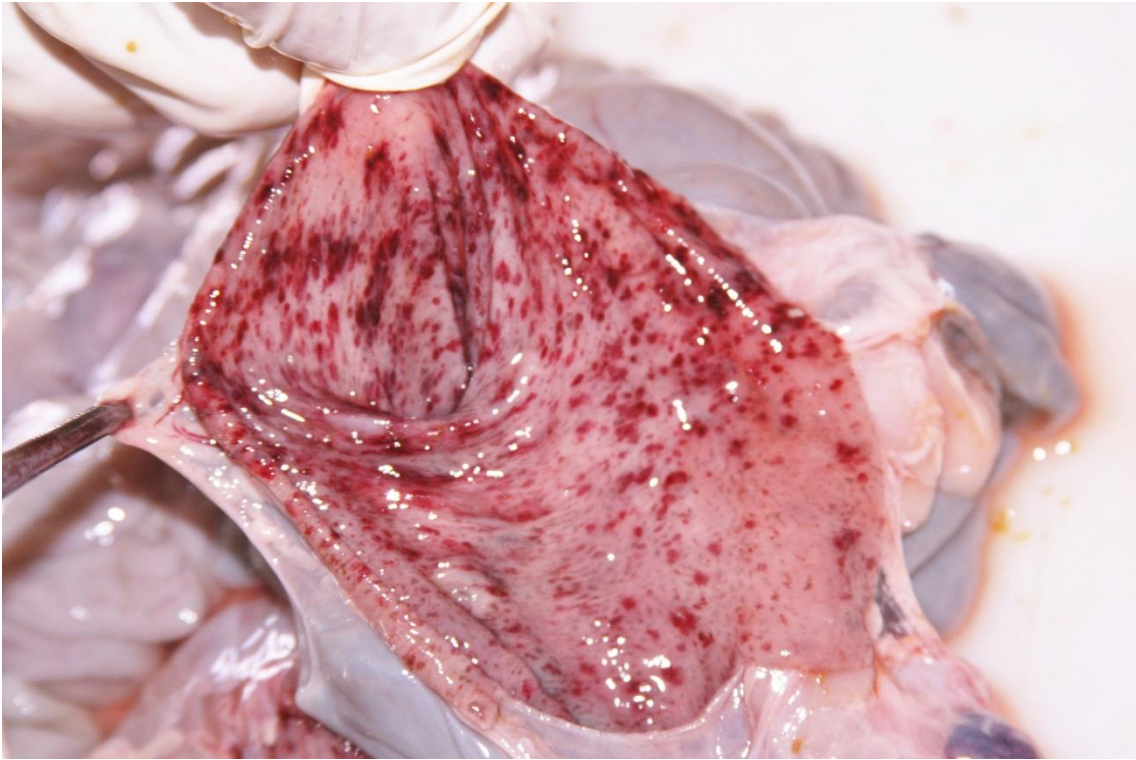
**Slika 14.** Krvarenja na poprečnom preseku limfnog čvora



**Slika 15.** III-sumnjiva-K grupa, prase br. S5: difuzna krvarenja po sluznici želuca



**Slika 16.** I-pozitivna-E2 grupa, prase br. 36: apatija, letargija, inapetencija



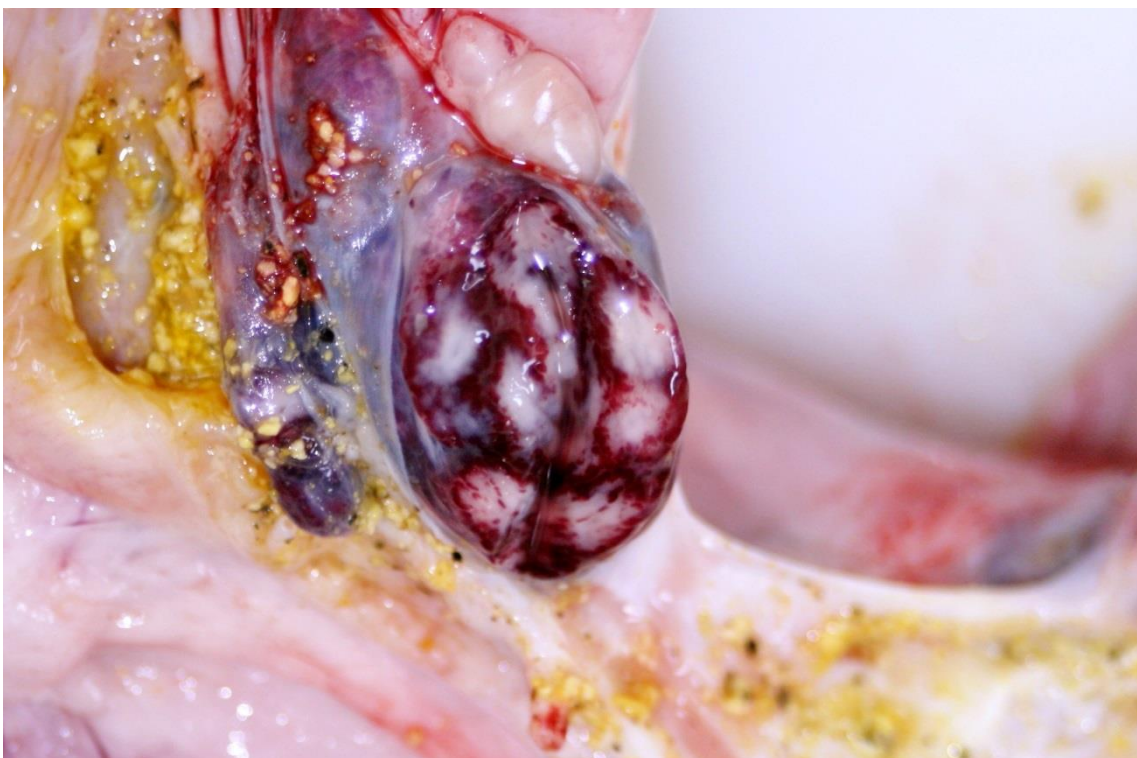
**Slika 17.** I-pozitivna-E2 grupa, prase br. 36: krvarenja po sluznici cekuma



**Slika 18.** Kontrolna grupa prasadi



**Slika 19.** Kontrolna grupa: krvarenja i nekrotične promene na sluznici žučne kese



**Slika 20.** Kontrolna grupa prasadi: hemoragični limfadenitis





**Slika 21.** Kontrolna grupa prasadi: kongestija i krvarenja u moždanom tkivu



**Slika 22.** Kontrolna grupa prasadi: tačkasta krvarenja po epikardu



**Slika 23.** Kontrolna grupa prasadi: hemoragični infarkti na slezini



**Slika 24.** Kontrolna grupa prasadi: difteroidno-nekrotični tiflitis

## BIOGRAFIJA

Jasna Prodanov-Radulović je rođena 11. juna 1972. godine, u Kisaču, opština Novi Sad. U Novom Sadu je završila osnovnu i srednju medicinsku školu, nakon čega upisuje studije na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Diplomirala 1999. godine sa prosečnom ocenom 8,79 (osam i 79/100). Poslediplomske studije je upisala školske 2000/01. godine, smer Patologija i terapija životinja i 2005. godine odbranila magistarsku tezu pod naslovom: "Ispitivanje dužine trajanja zaštitnog nivoa maternalnih antitela kod prasadi poreklom od krmača koje su vakcinisane protiv klasične kuge svinja" na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu, pred komisijom u sastavu: prof. dr Miroslav Valčić, mentor, prof. dr Nenad Milić i dr Sava Lazić. U maju 2009. godine je prijavila temu za doktorsku disertaciju po naslovom „Uticaj kolostralnih antitela na stepen imunosti prasadi vakcinisanih protiv klasične kuge svinja“.

Od 2000. godine pa do danas, zaposlena je u Naučnom institutu za veterinarstvo «Novi Sad», u okviru Zavoda za epizootologiju, klinička ispitivanja i reprodukciju, na Odeljenju za epizootologiju i zaštitu zdravlja svinja.

U naučno-istraživačkom radu, projektima i objavljenim naučnim i stručnim radovima Jasna Prodanov-Radulović je usmerena na proučavanje epizootologije, imunoprofilakse, dijagnostike, suzbijanja i iskorenjivanja zaraznih bolesti svinja. U periodu 2000-2012. godine učestvovala je u realizaciji ukupno deset naučnoistraživačkih projekata. Istovremeno, aktivno je objavljivala rezultate istraživanja u časopisima i zbornicima radova, na savetovanjima i skupovima u zemlji kao i u inostranstvu. U periodu 2000-2012. godine ukupno je objavila kao autor i koautor 154 stručna i naučna rada. Pri tome, u okviru 38 publikovanih radova i saopštenja proučavana tema je epizootologija, imunoprofilaksa i dijagnostika klasične kuge svinja. Aktivnosti u naučnoistraživačkom radu se nastavljaju, tako da je aktivni učesnik i u okviru dva projekta sa periodom realizacije 2011-2014. godina.

## **BIBLIOGRAFIJA (izvod iz perioda 2007-2012. godina)**

1. Polaček V., **Prodanov J.**, Lazić S., Petrović T., Rašić Z., Aleksić-Kovačević S.: Immunohistochemical Detection of B And T Lymphocytes In Mandibular Lymph Nodes Of Experimentally Infected Piglets With Classical Swine Fever Virus. *Acta Veterinaria*, 57, 2/3, p. 199-208, 2007.
2. **Prodanov J.**, Došen R., Pušić I., Bugarski D., Valčić M.: Passive immunity evaluation in piglets originating from sows vaccinated with china strain of classical swine fever virus. *Acta Veterinaria*, 57, 5/6, p. 413-427, 2007.
3. Lupulović D., Lazić S., **Prodanov-Radulović J.**, Jimé'nez de Oya N., Escribano-Romero E., Saiz J., Petrović T.: First Serological Study of Hepatitis E Virus Infection in Backyard Pigs from Serbia. *Food Environment Virology*, p. 110-113, 2010.
4. Lazić S., Petrović T., **Prodanov-Radulović J.**, Došen R.: Sprečavanje pojave klasične kuge svinja u seoskim domaćinstvima. Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo 'Novi Sad', 2011.
5. **Prodanov-Radulović J.**, Došen R., Stojanov I., Pušić I., Živkov-Baloš M., Ratajac R.: Interaction between mycotoxins and causative agents of swine infective diseases. *Proc. Nat. Sci. Matica srpska*, p. 251-259, 2011.
6. Pušić I., **Prodanov-Radulović J.**, Došen R., Stojanov I., Stojanović D., Petrović T.: Epizootical Characteristics of Aujeszky's disease in Vojvodina Region and Biosecurity Concernes. *Biotechnology in Animal Husbandry*, p. 875-882, 2011.
7. **Prodanov-Radulović J.**, Došen R., Pušić I., Stojanov I., Lupulović D., Ratajac R.: The transmission and spreading routes of Aujeszky's disease in swine population. *Biotechnology in Animal Husbandry*, p. 867-874, 2011.
8. Petrović T., Milićević V., **Prodanov-Radulović J.**, Maksimović-Zorić J., Lupulović D., Došen R., Lazić S.: Molecular detection and genetic analysis of Serbian PRRSV isolates. EuroPRRS2011 Symposium 'Understanding and combating PRRS in Europe' COST Action FA902, Novi Sad, 12th-14th October 2011, editors Tamaš Petrović, Tahar Ait-Ali, Proceedings, str. 50-56, Scientific Veterinary Institute 'Novi Sad'.
9. Došen R., **Prodanov-Radulović J.**, Pušić I., Gagrčin M.: Biosecurity measures in villages and rural households. International Conference prevention of Classical Swine Fever in the Border Region Croatia - Serbia (STOP-KKS), Novi Sad, June 7-8, 2012, Proceedings, p. 306-314, Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo 'NoviSad'.
10. Stojanović D., Ratajac R., Petrović T., **Prodanov-Radulović J.**: Quality control of two commercial vaccines against classical swine fever. International Conference prevention of Classical Swine Fever in the Border Region Croatia - Serbia (STOP-KKS), Novi Sad, June 7-8. 2012, Proceedings, p. 339-350, Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo 'Novi Sad'.
11. Toplak I., Lazić S., Lupulović D., **Prodanov-Radulović J.**, Becskei Z., Došen R., Petrović T.: Study of the genetic variability of porcine Circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica*, pp. 409-420, 2012.

## Prilog 1.

### IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisana Jasna Prodanov-Radulović

Broj upisa: Magistar veterinarskih nauka, Zakon o izmenama i dopunama Zakona o visokom obrazovanju iz 2008. godine.

#### Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom: „Uticaj kolostralnih antitela na stepen imunosti prasadi vakcinisanih protiv klasične kuge svinja“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 05.03.2013.

**Potpis doktoranda**



**Prilog 2.**

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE  
VERZIJE DOKTORSKOG RADA**

Ime i prezime autora: Jasna Prodanov-Radulović

Broj upisa:

Studijski program: Magistar veterinarskih nauka, Zakon o izmenama i dopunama  
Zakona o visokom obrazovanju iz 2008. godine.

Naslov rada: Uticaj kolostralnih antitela na stepen imunosti prasadi vakcinisanih  
protiv klasične kuge svinja

Mentor: prof. dr Miroslav Valčić

**Potpisana Jasna Prodanov-Radulović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj  
verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma  
Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog  
zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum  
odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u  
elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 05.03.2013.

**Potpis doktoranda**



### Prilog 3.

#### IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univezitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uticaj kolostralnih antitela na stepen imunosti prasadi vakcinisanih protiv klasične kuge svinja“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 05.03.2013.

**Potpis doktoranda**

