

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Ana M. Vasić

**UPOREDNA ANALIZA SEROLOŠKIH
METODA U DIJAGNOSTICI INFEKCIJE
VIRUSOM ZAPADNOG NILA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ana M. Vasić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF
SEROLOGICAL METHODS IN
DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED
BY WEST NILE VIRUS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR:

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

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Zoran Kulišić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za parazitologiju

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za mikrobiologiju sa imunologijom

Dr Tamaš Petrović, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad
Odeljenje virusologije

Dr Olga Dulović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
Klinika za infektivne i tropske bolesti

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Rezultati istraživanja su deo projekta „Ekološka i virusološka istraživanja prisustva emerging zoonoza u rezervatima prirode Republike Srbije“ (Ev.br. TR 37015), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2015. godine.

U toku rada na doktorskoj disertaciji imala sam nesebičnu pomoć i podršku brojnih profesora, kolega, prijatelja i porodice. Ovom prilikom želim da im zahvalim.

.....

Zahvaljujem se Mentoru Prof. dr Miroslavu Valčiću na pomoći, savetima i zalaganju tokom izrade doktorske disertacije. Bez njegove podrške u teškim trenucima završetak ove doktorske disertacije ne bi bio moguć.

Posebnu zahvalnost dugujem Dr Ani Gligić koja je svojom energijom, velikim znanjem i nesebičnim zalaganjem u mene usadila ljubav prema radu u laboratoriji. Bez njenih smernica, saveta i podrške izrada doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Zahvaljujem članovima Komisije na pomoći pri istraživanjima i izradi doktorske disertacije. Značajnim komentarima, sugestijama i savetima učinili su da ova doktorska disertacija bude bolja. Posebno hvala Dr Tamašu Petroviću i Prof.dr Olgi Dulović na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dela rada.

Zahvaljujem se kolegicama i kolegama sa Projekta TR 37015 na lepim trenucima pri zajedničkom radu koji će ostati u trajnom sećanju, kao i uspomena na Prof.dr Bosiljku Đuričić. Posebno hvala kolegici Dr Dragici Vojinović za sate provedene u zajedničkom radu, a kolegici Dr Živki Ilić na pomoći i podršci. Dr Draganu Rogožarskom hvala za pomoć pri uzorkovanju materijala i terenskom radu. Kolegama Mariji Manić, Nataši Prokić, Milici Elezović Radovanović i Jovanu Mariću hvala na pomoći prilikom uzorkovanja materijala i rada u laboratoriji.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela na korisnim savetima pri radu. Posebnu zahvalnost dugujem kolegici Svetlani Ristić koja mi je tokom cele izrade doktorske disertacije nesebično pomagala.

Zahvaljujem se Prof. dr Sunčici Borožan i Prof.dr Jovanu Bojkovskom na pomoći i podršci.

Zahvaljujem kolegama i kolektivu Naučnog instituta za veterinarstvo Novi Sad, Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije Beograd, Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije u Beogradu, Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Vojnomedicinskoj Akademiji u Beogradu.

Posebnu zahvalnost dugujem Prof. Norbert Nowotny, Univetmed, Vienna, Austria, Dr Anna Papa, School of Medicine, University of Thessaloniki, Greece, Prof. Nektarios Giadinis, School of Veterinary Medicine, University of Thessaloniki, Greece, Prof. Chrysostomos Dovas, School of Veterinary Medicine, University of Thessaloniki, Greece.

Zahvaljujem se kompaniji ID Vet, France i Promedia, doo, Zrenjanin za pomoć pri nabavci dijagnostikuma.

Svim ljudima koji su mi na bilo koji način pomogli, zahvaljujem na trudu i dragocenom vremenu koje su mi posvetili.

Zahvalna sam mojim prijateljima na strpljenju, savetima i ljubavi.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na bezgraničnoj ljubavi, podršci, strpljenju i osloncu kojeg sam imala na svakom koraku mog puta. Ova doktorska disertacija je njihova.

UPOREDNA ANALIZA SEROLOŠKIH METODA U DIJAGNOSTICI INFEKCIJE VIRUSOM ZAPADNOG NILA

Rezime

Virus Zapadnog Nila (*West Nile virus-WNV*) je izolovan 1937. godine u *West Nile* distriktu u Ugandi, po čemu je i dobio ime. Pripada familiji *Flaviviridae* i rodu *Flavivirus*. Prenosi se putem insekata-komaraca pa se svrstava u grupu Arbovirusa, a ptice predstavljaju prave domaćine i rezervoare virusa u prirodi. Čovek i sisari su slučajni domaćini koji obolevaju sa kliničkom slikom neuroinvazivnog oboljenja. Brojne epidemije koje je izazvao su bile praćene velikim brojem obolelih ljudi i životinja i materijalnim štetama. Serološka laboratorijska dijagnostika infekcije *WNV* je složena zbog unakrsnih reakcija sa drugim virusima iz iste familije (Japanski encefalitis, krpeljski encefalitis, Usutu i dr.), ali i odabira dijagnostičkog metoda koji će dati najoptimalnije rezultate.

Cilj istraživanja je bio da se pripreme „*in house*“ testovi (AGID, IFA i ELISA) za serološku dijagnostiku *WNV* i da se uporede dobijeni rezultati „*in house*“ testova sa rezultatima dobijenih primenom komercijalno dostupnih testova u cilju određivanja osetljivosti i specifičnosti upotrebljenih testova radi utvrđivanja koji od primenjenih testova su najpogodniji za otkrivanje infekcije *WNV*. Primenom pomenutih testova utvrđena je seroprevalencija u populacijama ispitivanih vrsta (konji, ljudi, psi) na odabranim lokalitetima Republike Srbije, što omogućava mapiranje ugroženih područja i definisanje mera kontrole i suzbijanja infekcije.

Ispitano je ukupno 153 krvna seruma ljudi, 303 krvna seruma konja i 184 krvna seruma pasa. Uzorci su prikupljeni u periodu od 2011.-2013. godine na ukupno 15 različitih lokaliteta- regiona Republike Srbije. Ustanovljena seroprevalencija je varirala u odnosu na lokalitet sa većom vrednošću u regionima u slivu Save i Dunava. Pripremljena su tri „*in house*“ testa (AGID, IFA i ELISA), a rezultati testova su upoređeni sa rezultatima komercijalno dostupnih testova. Statističkim poređenjem primenom McNemarove metode nisu utvrđene statistički značajne razlike između „*in house*“ IFA testa i komercijalno dostupnog testa na uzorcima poreklom od ljudi i konja. Primena IFA testa nije bila moguća na uzorcima poreklom od pasa usled nespecifične

reakcije. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između „*in house*“ ELISA i komercijalno dostupnog testa na uzorcima ljudi i konja, dok su postojale razlike na uzorcima pasa. Utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike samo između AGID i „*in house*“ ELISA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG testa na uzorcima poreklom od ljudi, dok su postojale značajne razlike između testova na uzorcima konja i pasa. Osetljivost i specifičnost testova je varirala u odnosu na ispitivanu vrstu. „*In house*“ IFA test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom na uzorcima ljudi imao je osetljivost od 89% i specifičnost 62%, dok je na uzorcima konja utvrđena osetljivost od 94% i specifičnost od 90%. „*In house*“ ELISA testa u poređenju sa komercijalno dostupnim testom kod ljudi je pokazao osetljivost od 20% i specifičnost 84%, dok su kod konja one iznosile 26% i 70%, a kod pasa 0% i 87,5%. AGID test u poređenju sa „*in house*“ IFA testom kod ljudi je pokazao osetljivost od 17% i specifičnost 94,5%, odnosno 0% i 100% kod konja. U poređenju sa „*in house*“ ELISA testom AGID test je pokazao osetljivost 13,2% i specifičnost 86,8% kod ljudi, odnosno: 48% i 100% kod konja. Utvrđeno je da je IFA najpogodniji metod za serološku dijagnostiku kod ljudi i konja, dok je kod pasa to ELISA metod. AGID je pokazao nisku osetljivost kod sve tri vrste što predstavlja značajno ograničenje u upotrebi ovog testa.

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo WNV antitela kod ljudi, konja i pasa na 14 od 15 ispitivanih lokaliteta, što govori o širokoj rasprostranjenosti WNV u Republici Srbiji. Neophodna je pristupačna, brza i efikasna serološka dijagnostika u svetlu pojave epidemija od 2012. godine. U cilju kontrole bolesti neophodno je sprovoditi mere kontrole populacije vektora, ali i konstantni monitoring populacije prijemčivih životinja i ljudi.

Ključne reči: Virus Zapadnog Nila, serološke metode, laboratorijska dijagnostika, konji, psi, ljudi

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija

UDK broj: 619:57.083.33:578.833.1

COMPARATIVE ANALYSIS OF SEROLOGICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED BY WEST NILE VIRUS

Summary

West Nile virus (*WNV*) was discovered in *West Nile* district of Uganda in 1937., and named after place of discovery. It is classified in fam. *Flaviviridae* and genus *Flavivirus*. *WNV* is transmitted via insects-mosquitos and it is a member of *Arbovirus* group. Birds are true hosts and reservoirs of virus in nature. Humans and other mammals are accidental hosts showing clinical signs of neuroinvasive disease. Numerous epidemics caused by *WNV* were followed by large number of affected people and animals and significant economical loses. Serological laboratory diagnostics is difficult due to cross reactions with other viruses from the same family (Japanese encephalitis virus, tick born encephalitis virus, Usutu etc), and right choice of diagnostic method which would give the most satisfactory results.

The goal of research was to prepare „*in house*“ tests (AGID, IFA and ELISA) for serological diagnostics of *WNV*, to compare the obtained results of „*in house*“ and commercially available test in order to determinate sensitivity and specificity of „*in house*“ tests and the most satisfactory tests in diagnostic of *WNV* infection. The seroprevalence was determined by use of prepared and available test in populations of horse, dog and human in investigated chosen regions of the Republic of Serbia, which enabled the mapping of endangered areas and definition of control and eradication measures.

Total of 153 human blood sera, 303 horse sera and 184 dog sera were collected in period from 2011. to 2013. in 15 different localities of the Republic of Serbia. Determined seroprevalence varies in localities with higher value in localities near Sava and Danube river. Three „*in house*“ test were made (AGID, IFA and ELISA) and the results were compared to results of commercially available test by use of McNemar test. The statistically significant differences were not established between „*in house*“ and commercial IFA test in horse and human samples. The use of IFA tests was not possible in dogs due to unspecific reaction. The statistically significant differences were not established between „*in house*“ and commercial ELISA test in horse and human

samples, but they existed in dog samples. There were no significant differences only between AGID and „*in house*“ and commercial IgG ELISA tests in human samples, while there were significant differences between AGID and other tests in horse and dog samples. Sensitivity and specificity of tests varied from one species to other. Comparing to the commercial test „*in house*“ IFA test had sensitivity of 89% and specificity of 62% in human samples and 94% and 90% in horse samples. Comparing to the commercial test „*in house*“ ELISA test had sensitivity of 20% and specificity of 84% in human samples, while 26% and 70% in horse, and 0% and 87,5% in dog samples. AGID test in comparison with „*in house*“ IFA test showed sensitivity of 17% and specificity of 94,5% in human and 0% and 100% in horse samples. AGID test in comparison with „*in house*“ ELISA test showed sensitivity of 13,2% and specificity of 86,8% in human and 48% and 100% in horse samples. IFA was established as the most adequate method for serological diagnostics in human and horse, while it was ELISA in dogs. AGID showed low sensitivity in all three species posing significant limitation factor in the use of this test.

The results showed the presence of WNV antibodies in human, horse or dog sera from 14 of 15 localities, which suggests wide spread of WNV in the Republic of Serbia. The available, fast and accurate serological diagnostics is needed in the light of epidemics from 2012. In order to control the disease it is necessary to control vector population and make constant monitoring of susceptible animal species and humans.

Key words: West Nile virus, serological methods, laboratory diagnostics, horse, dog, human

Scientific field: Veterinary medicine

Field of academic expertise: Epizootiology

UDK number: 619:57.083.33:578.833.1

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. PRVA IZOLACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA	5
2.2. KLASIFIKACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA I NJEGOVE KARAKTERISTIKE	5
2.3. KRUŽENJE VIRUSA ZAPADNOG NILA U PRIRODI	9
2.4. REPLIKACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA U ĆELIJI DOMAĆINA I PATOGENEZA BOLESTI	11
2.5. IMUNSKI ODGOVOR DOMAĆINA NA VIRUS ZAPADNOG NILA	12
2.5.1. Urođeni imunski odgovor domaćina na virus Zapadnog Nila	13
2.5.1.1. Urođeni imunski odgovor ćelija domaćina na virus Zapadnog Nila	13
2.5.1.2. Uloga sistema komplementa u odbrani od virusa Zapadnog Nila	13
2.5.1.3. Uloga interferona u odbrani od virusa Zapadnog Nila	14
2.5.2. Stečeni imunski odgovor domaćina na virus Zapadnog Nila	14
2.5.2.1. Humoralni imunski odgovor na virus Zapadnog Nila	14
2.5.2.2. Ćelijski imuni odgovor na virus Zapadnog Nila	15
2.6. KLINIČKA SLIKA, PATOMORFOLOŠKI NALAZ I DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA GROZNICE ZAPADNOG NILA KOD LJUDI, KONJA I PASA	16
2.6.1. Definicija kliničkog slučaja groznice Zapadnog Nila kod ljudi	16
2.6.2. Definicija kliničkog slučaja groznice Zapadnog Nila kod konja	18
2.6.3. Klinička slika, patomorfološki nalaz i diferencijalna dijagnostika groznice Zapadnog Nila kod konja	19
2.6.4. Klinička slika i patomorfološki nalaz groznice Zapadnog Nila kod pasa ..	21
2.6.5. Klinička slika i patomorfološki nalaz groznice Zapadnog Nila kod ljudi .	23
2.7. EPIDEMIOLOŠKA I EPIZOOTIOLOŠKA SLIKA VIRUSA ZAPADNOG NILA	24
2.7.1. Epidemiološka i epizootiološka slika groznice Zapadnog Nila u svetu do 2010. godine	24
2.7.2. Epizootiološka situacija za groznicu Zapadnog Nila u Evropi posle 2000. godine	29

2.7.3. Epidemiološka situacija groznice Zapadnog Nila u Evropi od 2010. godine	33
2.7.4. Epizootiološki i epidemiološki podaci o virusu Zapadnog Nila u Republici Srbiji posle 2000. godine	41
2.8 SEROLOŠKE METODE U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI INFEKCIJE VIRUSOM ZAPADNOG NILA	44
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	46
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA	46
3.2. ZADACI ISTRAŽIVANJA	46
4. MATERIJAL I METODE RADA	47
4.1. MATERIJAL	47
4.1.1. Materijal potreban za sakupljanje i obradu uzoraka krvnih seruma konja, pasa i ljudi sa odabranih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije	47
4.1.1.1. Uzorkovanje krvnih seruma konja	47
4.1.1.2. Uzorkovanje krvnih seruma pasa	48
4.1.1.3. Uzorkovanje krvnih seruma ljudi	49
4.1.2. Virus Zapadnog Nila	49
4.1.3. Materijal potreban umnožavanje virusa Zapadnog Nila	49
4.1.4. Materijal za dobijanje specifičnog imunog seruma na laboratorijskim životinjama	50
4.2. METODE RADA	51
4.2.1. Metoda određivanja koncentracije proteina po Lowry-u (<i>Folin-Ciocalteu method</i>)	51
4.2.2. Agar gel imunodifuziona metoda (AGID)	51
4.2.3. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)	53
4.2.3.1. Priprema „ <i>in house</i> “ testa indirektne imunofluorescencije (IFA)	53
4.2.3.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije	55
4.2.4. Imunoenzimski metod (ELISA)	57
4.2.4.1. Priprema „ <i>in house</i> “ imunoenzimskog indirektnog testa (ELISA)	58
4.2.4.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)	62
4.2.4.2.1 Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA) za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnim serumima konja i pasa	62

4.2.4.2.2. <i>Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA) za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnim serumima ljudi</i>	63
4.2.5. Geografsko mapiranje	64
4.2.6. Statistička obrada dobijenih rezultata	64
5. REZULTATI	66
5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA PO LOWRY-U (<i>FOLIN-CIOCALTEU METHOD</i>)	66
5.2. KRVNI SERUMI LJUDI	66
5.2.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)	67
5.2.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)	70
5.2.2.1. „ <i>In house</i> “ test indirektne imunofluorescencije	70
5.2.2.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije	72
5.2.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)	74
5.2.3.1. „ <i>In house</i> “ imunoenzimski test (ELISA)	74
5.2.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)	75
5.2.4. Uporedni rezultati dijagnostičnih testova na krvnim serumima ljudi	79
5.2.5. Statistička analiza rezultata	79
5.2.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al., 2000	82
5.3. KRVNI SERUMI KONJA	83
5.3.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)	84
5.3.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)	87
5.3.2.1. „ <i>In house</i> “ test indirektne imunofluorescencije	87
5.3.2.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije	90
5.3.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)	92
5.3.3.1. „ <i>In house</i> “ imunoenzimski test (ELISA)	92
5.3.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)	95
5.3.4. Uporedni rezultati dijagnostičnih testova na krvnim serumima konja	98
5.3.5. Statistička analiza rezultata	99
5.3.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al., 2000	101
5.4. KRVNI SERUMI PASA	102
5.4.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)	103

5.4.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)	103
5.4.2.1. „ <i>In house</i> “ test indirektne imunofluorescencije	103
5.4.2.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije	103
5.4.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)	104
5.4.3.1. „ <i>In house</i> “ imunoenzimski test (ELISA)	104
5.4.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)	106
5.4.4. Uporedni rezultati dijagnostičnih testova na krvnim serumima pasa	109
5.4.5. Statistička analiza rezultata	110
5.4.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al.,2000	111
5.5. GEOGRAFSKO MAPIRANJE	112
6. DISKUSIJA	113
7. ZAKLJUČCI	123
8. SPISAK LITERATURE	125
PRILOG 1	147
PRILOG 2	160
PRILOG 3	189
BIOGRAFIJA	
IZJAVA O AUTORSTVU, IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA, IZJAVA O KORIŠĆENJU	

1. UVOD

Groznica Zapadnog Nila (*West Nile Fever*) je virusom izazvana zoonoza koju prenose insekti-artropode. Virus Zapadnog Nila (*West Nile virus-WNV*) je prvi put izolovan 1937. godine iz krvi čoveka sa simptomima groznice u West Nile distriktu u severnom delu Ugande. Tokom poslednje decenije brzo se proširio Evropom izazivajući epizootije i epidemije sa smrtnim ishodom. Pored opasnosti po zdravlje životinja i ljudi, *WNV* izaziva i značajne direktne i indirektne materijalne štete.

Virus Zapadnog Nila je klasifikovan u rod *Flavivirus* familije *Flaviviridae*. Pripada grupi Arbovirusa (ARBO-Arthropode-borne virus), koje prenose insekti. To je heterogena grupacija virusa, svrstanih u 9 familija i 20 rodova sa zajedničkom karakteristikom da su mnogi uzročnici veoma važnih infektivnih oboljenja životinja i ljudi. Rasprostranjeni su svuda u svetu u zavisnosti od prisustva vektora (raznih vrsta hematofagnih insekata), prijemčivih organizama i klimatskih faktora. Do sada je identifikovan veliki broj vrsta komaraca koji prenose *WNV*, a pripadaju rodovima *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Orthopodomyia*, *Psorophora*, *Uranotaenia* i dr. Postoje podaci o izolaciji *WNV* iz nekoliko različitih vrsta krpelja, pa se smatra da oni predstavljaju rezervoare virusa u prirodi i potencijalnu opasnost za prenošenje virusa. U prirodi virus cirkuliše između vektora-artropoda, ptica koje su pravi domaćini i rezervoari u prirodi, i sisara i reptila koji su slučajni domaćini. Od groznice Zapadnog Nila najčešće i sa najtežim posledicama oboljevaju ljudi i ekvidi, kao i veliki broj drugih životinjskih vrsta, među kojima se po posledicama naročito ističu psi (*Canis domesticus*), mačke (*Felis domesticus*), goveda (*Bos bovis*), medvedi (*Ursus arctos*), foke (*Phoca vitulina*), kitubica (*Orcinus orca*), aligatori (*Alligator mississippiensis*), guske (*Anser anser*), ćurke (*Meleagris gallopavo*) i dr.

Groznica Zapadnog Nila ima sezonski karakter, koji se poklapa sa periodima aktivnosti vektora u prirodi. Na području Republike Srbije period aktivnosti komaraca je od maja meseca do oktobra sa najvećom učestalošću u junu i julu, kada se i očekuje pojava kliničkih slučajeva bolesti kod prijemčivih vrsta životinja i ljudi (tokom jula i avgusta). Sa promenama klime koja se beleži poslednjih godina, primećena je i pojava novih vrsta vektora- komaraca koji pre nisu bili prisutni na teritoriji Evrope. Ovi vektori

doprinosi brzom širenju patogena koje sa sobom donose. Od pojave novih vektora možda je opasniji uticaj klimatskih promena na već postojeće vrste komaraca. Blage zime i jako topla leta produžavaju period aktivnosti komaraca, a i povećavaju stepen preživljavanja odraslih. Time se pospešuje održavanje virusa u vektorima, što doprinosi uspešnom održavanju virusa u prirodi kada se jednom pojavi na nekom području.

Kod ljudi je infekcija najčešće asimptomatska. Simptomatske neuroinvazivne forme bolesti koje se javljaju najčešće u odnosu 1 na 150 se manifestuju kao encefalitis, meningitis i akutna flacidna paraliza, uz smrtnost oko 10-15%. Posebno ugrožena vrsta životinja su konji pošto se u kliničkoj slici često javljaju encefalitis sa letalnim ishodom. Kod pasa *WNV*, pored simptoma oboljenja centralnog nervnog sistema, može da izazove promene na bubrezima i srčanom mišiću. Tokom epidemije u Sjedinjenim američkim državama (SAD) 1999. godine primećeno je da serokonverzija kod pasa prethodi masovnoj pojavi bolesti kod ljudi, te se uspešno mogu koristiti kao indikator širenja virusa.

Od prve izolacije virusa 1937. godine *WNV* se brzo proširio u svetu i danas se može naći na svim kontinentima osim Antartika. Izolati *WNV* su svrstani u osam genetskih linija (uz mogućnost postojanja i devete) od kojih su dve glavne: linija 1 postoji u severnoj Americi, severnoj Africi, Evropi i Australiji, dok je linija 2 bila endemska za južnu Afriku i Madagaskar. Smatralo se da linija 2 izaziva samo blage infekcije i da je generalno niske virulencije, dok nije dokazano da virus linije 2 može da izazove tešku kliničku sliku bolesti kod prijemčivih organizama. Izolacijom linije 2 iz jastreba koji je uginuo sa simptomima encefalitisa u Mađarskoj dokazano je širenje visoko virulentnog *WNV* izvan Afričkog kontinenta. Od tada virus linije 2 se brzo raširio Evropom, izazivajući brojne epidemije i epizootije praćene letalnim ishodom. Virus linije 1 i dalje cirkuliše u Evropi izazivajući sporadična oboljenja, kao i varijante virusa prisutne u Rusiji koje svake godine izazivaju manje ili veće epidemije. Od brojčano značajnih epidemija zabeleženih u Evropi treba posebno istaći epidemiju u Rumuniji, 1996. godine, Rusiji 1999. godine, Grčkoj 2010. godine, ali i epidemije u Republici Srbiji, 2012. i 2013. godine.

Uspešnost nadzora i sprečavanja širenja svake infektivne bolesti, pa i groznice Zapadnog Nila zavisi od sposobnosti brze detekcije i karakterizacije uzročnika.

Prema *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE Terrestrial Manual-Chapter 2.1.20., 2013.) u cilju dijagnostike *WNV* mogu se primeniti dve vrste laboratorijskih ispitivanja:

1. Identifikacija uzročnika- koja se može vršiti na više načina

- Izolacijom uzročnika u *in vivo* i *in vitro* sistemima (kulturama ćelija i embrioniranim pilećim jajima)
- Detekcijom nukleinske kiseline primenom molekularnih metoda i
- Imunohistohemijskim dokazivanjem uzročnika

2. Serološka ispitivanja-koja služe za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela za *WNV*

Uspeh dokazivanja uzročnika pokušajem izolacije u *in vivo* i *in vitro* sistemima (kulturama ćelija i embrioniranim pilećim jajima) često je u zavisnosti od adekvatnog uzorkovanja i dobijenog materijala. U dijagnostici bolesti kod živih životinja i ljudi ima ograničen značaj. Zbog kratke faze viremije pokušaj izolacije iz krvi ne dovodi do uspeha. Slično je i sa upotrebom cerebro-spinalne tečnosti kao materijala za izolaciju.

Kao materijal za uspešnu izolaciju virusa mogu poslužiti i organi uginulih životinja. Virus se može izolovati i iz tkiva vektora- komaraca.

Dokazivanje prisustva ribonukleinske kiseline (*RNK*) *WNV* primenom lančane reakcije polimeraze (*PCR*) odnosno lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*real time RT-PCR*) je savremen i brz način dokazivanja uzročnika. Razvijeno je nekoliko različitih protokola koji se danas koriste u laboratorijskoj dijagnostici širom sveta. Ipak primena ovih metoda je skupa i zahteva dobru opremljenost laboratorija.

Imunohistohemijsko dokazivanje uzročnika podrazumeva bojenje isečaka tkiva fiksiranih u parafinu. Specifičnost detekcije zavisi od vrste antitela koja se upotrebljavaju.

Serološke metode su u širokoj upotrebi, prvenstveno zbog mogućnosti indirektno dijagnostike prisustva patogena kod živih jedinki utvrđivanjem specifičnih antitela. Od velikog broja poznatih metoda u serološkoj laboratorijskoj dijagnostici, preporučeni su IgM i IgG imunoenzimska metoda (*ELISA*), metoda hemaglutinacije-inhibicije hemaglutinacije, metoda redukcije i neutralizacije plakova (*PRNT*), i neutralizacija virusa u mikrotitar pločama (*VNT*). Smatra se da je metoda redukcije i neutralizacije plakova najspecifičnija od svih seroloških metoda za otkrivanje prisustva specifičnih antitela za *WNV*, ali se izvodi samo u pojedinim laboratorijama. Svaka serološka metoda

ima svoju upotrebnu vrednost, ali najčešće izvođenje samo jedne metode nije dovoljno za sigurno postavljanje dijagnoze. U istraživanjima nije utvrđena značajna razlika između rezultata dobijenih upotrebom „*in house*” testova i komercijalnim dijagnostičkim sredstvima (kitovima). Izbor najadekvatnijih dijagnostičkih metoda i definisanje dijagnostičkih karakteristika dostupnih testova za primenu u laboratorijama različitog stepena opremljenosti ima veliki značaj za brzu i pravovremenu reakciju u cilju kontrole bolesti i zaštite zdravlja životinja i ljudi.

Pri tumačenju rezultata seroloških testova treba obratiti pažnju na mogućnost unakrsne reaktivnosti sa drugim virusima kao što su virus Japanskog encefalitisa, virus krpeljskog encefalitisa, Usutu virus i dr. Takođe, zbog uvođenja vakcinacije u populaciji konja i ovaj anamnestički podatak treba razmotriti radi pravilnog tumačenja rezultata seroloških testova.

Određivanje seroprevalencije putem upotrebe seroloških metoda omogućava konstantno praćenje kretanja-cirkulacije *WNV* na određenoj teritoriji i izradu mapa rasprostranjenosti. Zbog nepovoljne epizootiološko-epidemiološke situacije u Republici Srbiji ovo je od posebnog značaja radi pravovremenog delovanja na suzbijanju vektora-komaraca i sprečavanju pojave bolesti u epidemijским i epizootijskim razmerama.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. PRVA IZOLACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA

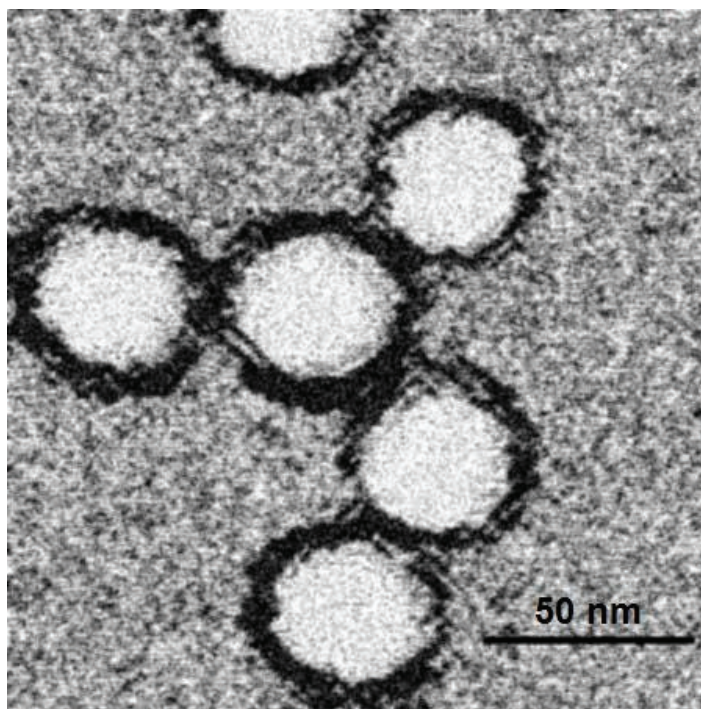
Virus Zapadnog Nila (*West Nile virus-WNV*) je izolovan 1937. godine u *West Nile* distriktu u Ugandi, po čemu je i dobio ime. U radu objavljenom 1940. godine Smithburn i sar. navode da je izolovani virus iz krvi čoveka sa simptomima groznice neurotropan. Oni prvi put opisuju virus, njegove osnovne imunološke karakteristike, opis dejstva virusa na laboratorijskim životinjama, patološke lezije koje izaziva, a opisuju i sličnost sa drugim virusima iste grupe. Navode da je uočena virusna čestica bila veličine 21 do 31 μm . U krvnom serumu pacijenta nisu postojala neutralizujuća antitela u vreme nastanka bolesti, dok su se ona pojavila posle 3 meseca. U opisu virusa stoji da je on patogen za miševе kada se inokuliše intracerebralno, intranazalno ili intraperitonealno, dok je blago patogen posle subkutane aplikacije. Izaziva simptome encefalitisa i dovodi do smrtnog ishoda kod rezus majmuna (*Macaca rhesus*) dok afrički majmun (*Cercopithecus ethiops centralis*) reaguje pojavom groznice i stvaranjem neutralizujućih antitela. Autori navode da virus nije patogen za kuniće i zamorce, ali nastaje serokonverzija. Takođe ukazuju i na moguću klasifikaciju činjenicom da je virus imunološki blizak virusu Japanskog encefalitisa i možda *Louping ill* virusu. Patološke lezije koje nastaju pri pojavi bolesti su ograničene na centralni nervni sistem i deluju različito od lezija koje pravi drugi poznati neutotropni virusi (Smithburn et al., 1940).

2.2. KLASIFIKACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA I NJEGOVE KARAKTERISTIKE

Virus Zapadnog Nila je danas klasifikovan u rod *Flavivirus* familije *Flaviviridae*. Familija *Flaviviridae* obuhvata uzročnike značajnih bolesti životinja i ljudi. Podeljena je u četiri roda (International Comitee on Taxonomy of Viruses, 2015):

1. *Flavivirus*- koji broji 45 različitih virusa i u kojeg su svrstani virusi uzročnici groznice Zapadnog Nila, Žute groznice, *Louping ill* virus, virus Japanskog encefalitisa, virus Veselsbronske bolesti, virus Izraelskog meningoencefalomijelitisa ćuraka i dr.

2. *Pestivirus*- u koji su svrstani virusi uzročnici Goveđe virusne dijareje (*BVD*) virusi BDVD 1 i BDVD 2, virus *Border* bolesti i virus Klasične kuge svinja (*KKS*).
3. *Hepacivirus*- u koji je svrstan virus *Hepatitis C*
4. *Pegivirus*- u koji je svrstan *Pegivirus 1 i 2*.



Izvor: Wikipedia, www.wikipedia.org

Slika 1. Prikaz virusa groznice Zapadnog Nila (elektronsko mikroskopski snimak)

Virus Zapadnog Nila pripada serokompleksu virusa Japanskog encefalitisa zajedno sa sledećim virusima na osnovu parametra unakrsne reakcije poliklonskih seruma pri reakciji neutralizacije (Calisher et al., 1989):

1. Virus Japanskog encefalitisa
2. St. Louis encefalitis virus
3. Murray valley encefalitis
4. Kunjin virus (podtip *WNV*)
5. Alfuy virus (podtip Murray valley encephalitis virusa)

Virus Zapadnog Nila, kao i ostali virusi koji su klasifikovani u familiju *Flaviviridae*, je pozitivnog polariteta, jednolančani virus koji sadrži ribonukleinsku kiselinu (*RNK*). Veličine je od 40 do 60 nm u prečniku. Ima ikosaedarni kapsid veličine 30 do 35 nm koji se sastoji iz više kopija proteina kapsida veličine 12 kDa. Kapsid

obavija RNK veličine 12.000 nukleotida koja je upakovana u C protein. Na oba kraja 3' i 5' nukleotidne sekvence postoje nekodirajući regioni. Genom virusa ima jedan otvoreni okvir- open reading frame (ORF). Genom virusa kodira ukupno 10 lanaca proteina od koji su 3 strukturalna (protein E, M i C) i sedam nestrukturalnih proteina (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b i NS5). Virus ima omotač koji potiče od ćelije domaćina, koji je prilagođen virusu prolazom dva integralna membranska glikoproteina, E (53 kDa) i proteina M (18-20 kDa). Glikoprotein E je savijen, izdužen dimer protein oblika štapića koji se nalazi na površini omotača, što daje gladak izgled virusnoj čestici. Spoljašnji domen od 470 aminokiselina se može podeliti u tri domena: centralni domen I koji obuhvata antigene sačinjen je od 50 N terminalnih aminokiselina i segmenta koji sadži mesto N-glikozilacije, domen II koga čine dve petlje koje sadrže visoko konzerviranu sekvencu aminokiselinskih rezidua od 98 do 111 aminokiselina i moguće sekvencu za fuziju virusa i domen III koji liči na konstantnu regiju imunoglobulina koji ima ulogu u vezivanju za ćelijske receptore. Glikoprotein E je zapravo virusni hemaglutinin. Glikoprotein E ima biološki važne uloge u sazrevanju virusne čestice, prepoznavanju ćelijskih receptora, fuziji sa endozomskim membranama ćelije, aglutinaciji eritrocita i indukciji B i T ćelijskih imunskih odgovora (Deubel et al., 2001). Protein prM je intracelularni prekursor proteina M koji se razlaže dejstvom celularnih proteaza (furin) pri čemu nastaje protein M koji se inkorporiše u zreo virion. M protein u ektodomenu ima kratak lanac od 41 aminokiseline. Genom virusa kodira sedam nestrukturalnih proteina (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b i NS5) koji pokreću replikaciju ovog virusa koja se obavlja u citoplazmi inficirane ćelije. Virus se iz ćelije osobađa putem egzocitoze (Petersen and Roehrig, 2001). NS1 je kofaktor virusne replikaze i izlučuje se iz inficiranih ćelija. NS2a je inhibitor interferona (IFN) dok NS3 ima aktivnost proteaze, NTPaze i helikaze. NS2b je kofaktor potreban za NS3 proteolitičku aktivnost. NS4a i NS4b moduliraju signalni put interferona. NS5 kodira RNK-zavisnu RNK polimerazu i metiltransferazu (Samuel and Diamond, 2006).

Na osnovu filogenetske analize izolata *WNV* do sada je utvrđeno postojanje osam, a potencijalno i devet genetskih linija:

Linija 1- koja se deli na: liniju 1a-izolati iz Evrope, Afrike, Azije, Bliskog Istoka i Sjedinjenih američkih država (SAD) (Ahmadnejad, 2012);

Linija 1b- izolati iz Australije (Kunjin virus (KUNV))- (Ahmadnejad, 2012);

Linija 2- Izolati iz delova Afrike, Madagaskara i Evropa (Lanciotti et al., 1999);
Linija 3- izolati iz centralne Evrope (Rabensburg virus) (Bakonyi et al., 2005);
Linija 4- izolati iz Rusije (L'vov et al, 2004);
Linija 5- izolati iz Indije, ranije klasifikovani kao linija 1c (Bondre et al., 2007);
Linija 6- Malezijski izolat Kunjin virusa (KUNV) (Hall et al., 2001);
Linija 7- Afrički Koutango virus izolovan u Senegal (KOUV)- (Scherret et al., 2001);
Linija 8- Izolati iz Španije (Vazquez et al., 2010).

Najveći broj izolata *WNV* su svrstani u 2 glavne genetske linije: linija 1 postoji u severnoj Americi, severnoj Africi, Evropi i Australiji, dok je linija 2 bila endemska za južnu Afriku i Madagaskar (Burt et al., 2002; Lanciotti et al., 1999). Među izolatima koji su klasifikovani u liniju 1 filogenetski posebno važno mesto zauzima prototip Egipt 101, kao i izolati iz epidemije u SAD 1999. godine i Italije 1998. Vremenom podgrupe izolata linije 1 (linija 1c, Kunjin virus) su predloženi za posebne linije *WNV*. Smatralo se da linija 2 izaziva samo blage infekcije i da je niske virulencije, dok nije dokazano da je linija 2 izazvala tešku kliničku sliku bolesti u južnoj Africi (Burt et al., 2002). Izolacija linije 2 *WNV* u Mađarskoj kod jastreba uginulog od encefalitisa, stavila je u prvi plan tvrdnju da se linija 2 prenosi putem migratornih ptica izvan Afričkog kontinenta i da izaziva pojavu teške kliničke slike kod obolelih jedinki (Bakonyi et al., 2006). Velike epidemije u Evropi među kojima se po broju obolelih ističe epidemija u Grčkoj poslednjih godina izazvane su *WNV* linije 2 (Barzon et al., 2013). Verovatno da je epidemija u Republici Srbiji izazvana virusom linije 2 jer je njegovo prisustvo u Srbiji dokazano (Petrović et al., 2013). Istraživanjima u Republici Češkoj blizu grada Rabensburga posle poplava 1997. godine izolovan je virus (soj 97-103) koji je pokazivao bliske antigenske veze sa *WNV*. Rabensburg virus pokazuje 75-77% identičnosti nukleotida i 89-90% identičnosti aminokiselina sa reprezentativnim virusima linije 1 i 2. Drugi izolat Rabensburg virusa (99-222) je izolovan na istoj lokaciji dve godine posle prvog (Bakonyi et al., 2005). Ovaj virus je predložen kao linija 3 *WNV*. Linija 4 je izolovana iz krpelja vrste *Dermacentor marginatus* u predelu planine Kavkaz u Rusiji- izolat LEIV-Krnd88-190. (L'vov et al., 2004). Filogenetskom analizom 15 izolata iz Indije od kojih su 14 izolovani u periodu od 1955. do 1982. pokazano je da 13 izolata čini posebnu liniju 5 *WNV*, dok su dva izolata (iz čoveka 1967. godine i izolat iz slepog miša izolovan 1968. godine) pokazala blisku srodnost sa

izolatima linije 1 (Bondre et al., 2007). Kunjin virus je prvi put izolovan iz komarca *Culex annulirostris* 1960. godine u severnoj Australiji. Izolat iz Malezije kao i Koutango virus izolovan u Senegal predstavlja posebne linije virusa (Hall et al., 2001). Iz pula komaraca (*Culex pipiens*) 2006. godine u močvarama jugozapadne Španije dokazano je prisustvo *WNV*. Virus pokazuje vezu sa linijom 3. Najmanja genetska razlika je postojala sa linijom 4, dok je najveća bila sa linijom 5 *WNV*. Na osnovu genetske analize Vazquez i sar. 2006. god su zaključili da se njihov izolat ne može svrstati pod postojeće genetske linije i da potencijalno predstavlja novu liniju *WNV* (Vazquez et al., 2010).

Pachler i sar. u decembru 2014. godine objavljuju podatak o potencijalno novoj, devetoj liniji *WNV* koji je izolovan iz pula *Uranotaenia unguiculata* komaraca u Austriji. Filogenetska analiza upućuje da se radi o novoj liniji ili eventualno podliniji linije 4 (Pachler et al., 2015).

2.3. KRUŽENJE VIRUSA ZAPADNOG NILA U PRIRODI

U prirodi *WNV* se kreće u cirkulaciji između vektora-insekata i ptica koje su pravi domaćini ovog virusa. U sporednim tokovima infekcije tzv. „*dead end*“ oboljeva veliki broj vrsta sisara i čovek.

Sposobnost prenošenja *WNV* ima veliki broj vrsta komaraca, a koji pripadaju rodovima *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Orthopodomyia*, *Psorophora*, *Uranotaenia* i dr. (www.cdc.gov). Hubalek i Halouzka navode da u Evropi glavne vrste komaraca koji prenose *WNV* pripadaju rodu *Culex* (*Culex pipiens*, *Culex modestus*, *Culex univittatus*) i rodu *Coquillettidia* (*Coquillettidia richiardii*) (Hubalek and Halouzka, 1999). Pojava novih-invazivnih vrsta komaraca u Evropi i Republici Srbiji se dešava zajedno sa pomeranjem klimatskih zona usled pojave globalnog zagrevanja planete. Tako je registrovana pojava sledećih vrsta komaraca- vektora *WNV* roda *Aedes* u Evropi od 1979. godine: *Aedes albopictus*, *Aedes japonicus*, *Aedes aegypti*, *Aedes koreicus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes triseriatus* (Petrić i sar., 2012). Intenzivan promet i saobraćaj u savremenom svetu pogoduje daljem širenju vektorskih vrsta koje sa sobom donose nove patogene. Tako je npr. vrsta *Culex*

quinquefasciatus koja je označena kao potencijalni vektor *WNV* u Holandiju stigla putem avionskog transporta (Scholte et al., 2010).

Posle ingestije krvnog obroka koji u sebi sadrži infektivne virione arbovirusa, pa i *WNV*, postoje različite mogućnosti za prodor virusa i dalju diseminaciju po tkivima artropodnih vektora. Najčešće dolazi do prodora virusa iz srednjeg creva komaraca ka tkivima i posledične migracije između ostalih i ka pljuvačnim žlezdama. Ponekad se virioni zadržavaju u predelu srednjeg creva, a ponekad virus ne prodire u tkiva komaraca. Način ponašanja virusa posle ingestije u hematofagnim artropodama zavisi od vrste virusa, vrste artropode –vektora i imunskog sistema vektora. *WNV* se najčešće može naći u pljuvačnim žlezdama vektora, a potom se prenosi na domaćina u procesu uzimanja obroka krvi posle uboda vektora (komaraca, krpelja).

Pokazalo se da su različite vrste komaraca različito prijemčive za infekciju sa *WNV*. Turell i sar. navode da su komarci vrste *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus* i *Aedes japonicus* jako prijemčivi za *WNV* i sve jedinke su imale diseminovanu infekciju i prenosile virus putem uboda. *Culex pipiens* i *Aedes sollicitans* su umereno osetljivi na infekciju sa *WNV* dok se pokazalo da su *Aedes vexans*, *Aedes aegypti* i *Aedes taeniorhynchus* relativno refraktarni, ali po nekad i oni prenose virus putem uboda. Kod *Culex pipiens* zabeležena je i vertikalna transmisija *WNV* (Turell et al., 2001).

Virus Zapadnog Nila je takođe izolovan iz drugih hematofagnih artropoda- krpelja u pojedinim regionima Rusije (Platonov, 2001). L'Vov i sar. su izolovali *WNV* iz lutke krpelja *Hyalomma marginatum* u delti reke Volge u regionu Astrakhana 2001. godine (L'Vov et al., 2002). Lawrie i sar. su pokazali da krpelji *Ixodes ricinus* i *Ornithodoros moubata* mogu da budu inficirani sa *WNV*, a time i vektori za *WNV*. Virus se nije održao u krpelju *Ixodes ricinus*, dok je u krpelju *O. moubata* virus perzistirao 132 dana. Autori navode da je verovatnije da krpelji u prirodi imaju ulogu rezervoara virusa, nego prenosioaca (Lawrie et al., 2004).

Pravi domaćini u kojima se *WNV* uspešno umnožava su ptice. Dokazano je da viremija kod drugih životinjskih vrsta i čoveka ne traje dovoljno dugo da bi oni bili izvor infekcije za vektore (Komar, 2000), što nije slučaj sa pticama gde je čak dokazana transmisija virusa u laboratorijskim uslovima bez posredovanja vektora (McLean et al., 2001).

Od groznice Zapadnog Nila oboljevaju različite životinjske vrste i čovek u sporednom toku infekcije tzv. „*dead end*“ domaćini. Najčešće i sa najtežim posledicama oboljevaju ljudi i ekvidi. Virus Zapadnog Nila ugrožava veliki broj životinjskih vrsta, među kojima se ističu sisari- psi (*Canis domesticus*), mačke (*Felis domesticus*), medvedi (*Ursus arctos*), foke (*Phoca vitulina*), kit-ubica (*Orcinus orca*), ali i reptili- aligatori (*Alligator mississippiensis*), kao i ptice-ćurke (*Meleagris gallopavo*), guske (*Anser anser*), nojevi (*Struthio camelus*) (Lichtensteiger et al., 2003; Madić et al., 1993; Del Piero et al., 2006; Leger et al., 2011; Miller et al., 2003; Ebel et al., 2002).

2.4. REPLIKACIJA VIRUSA ZAPADNOG NILA U ĆELIJI DOMAĆINA I PATOGENEZA BOLESTI

Virus Zapadnog Nila se uspešno umnožava u ćelijama insekata, ptica i sisara. Da bi virusi koji sadrže omotač ušli u ćeliju potrebno je sadejstvo proteina virusa koji služe za vezivanje sa ćelijom domaćina sa ćelijskim receptorima, koreceptorima i kofaktorima koji pokreću kaskadne reakcije potrebne za ulazak virusa. Ulazak *WNV* u ćeliju domaćina se odvija putem klatrin posredovane endocitoze uz prethodno vezivanje virusa za receptore (Ng and Lau, 1988). Smatra se da domen III proteina E omotača flavivirusa ima ulogu u vezivanju virusa za ćelijski receptor ćelije domaćina. Do danas nije sa sigurnošću utvrđeno da postoje specifični ćelijski receptori odgovorni za vezivanje *WNV*, ali je utvrđeno učešće određenih molekula kao što su receptor manoze, glukozaminoglikani, DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM) 3-grabbing non-integrin) i integrin $\alpha_v\beta_3$ (Davis et al., 2006; Colpitts et al., 2012, Chu et al, 2004). Međutim, postoje i podaci da integrini nisu odlučujući molekuli za ulazak *WNV* u ćelije i da je najverovatnije potrebno učešće i drugih, neidentifikovanih molekula (Schmidt, 2012).

Replikacija *WNV* se odigrava u perinuklearnoj regiji endoplazmatskog retikuluma. Translacija proteina se odvija preko granulisanog endoplazmatskog retikuluma, a potom se vrši translokacija proteina prM, E i NS1 u lumen endoplazmatskog retikuluma. Proteini PrM i E su u formi heterodimera i tako ulaze u sastav nezrele virusne čestice. Virioni se transportuju do ćelijske membrane, a potom dolazi do oslobađanja proteina

M iz prekusora prM u poslednjoj fazi egzocitoze, što dovodi do sazrevanja virusa (Stadler et al., 1997).

Posle uboda komarca-vektora *WNV* dolazi do infekcije keratinocita i Langhansovih ćelija koje migriraju ka regionalnom limfnom čvoru gde dolazi do primarne replikacije virusa. Virus se potom širi ka unutrašnjim organima gde se odvija drugi ciklus replikacije. U zavisnosti od stepena viremije virus može da preskoči barijeru krv-mozak i tada nastaje meningo-encefalitis. Do danas opisuju se 4 načina ulaska virusa u centralni nervni sistem:

1. Infekcija ili pasivni transport preko endotela ili epitelijalnih ćelija horioidnog pleksusa,
2. Infekcija olfaktornog neurona,
3. Unos virusa putem inficiranih ćelija imunskog sistema i
4. Direktni aksonski retrogradni transport iz inficiranih perifernih neurona

Po ulasku u centralni nervni sistem hemijski medijatori- citokini kao što su katepsini i plasmin, koga proizvode inficirani monociti i glija ćelije dovode do migracije leukocita iz perivaskularnog prostora u parenhim mozga. Inficirani neuroni i glija ćelije luče neurotoksične medijatore koji dovode do smrti ćelija. Smrt ćelija je posredovana kaspaza-9 i kaspaza-3 putevima koji su zavisni od kapsida *WNV* (Lim et al., 2011).

2.5. IMUNSKI ODGOVOR DOMAĆINA NA VIRUS ZAPADNOG NILA

U razvoju kliničke slike groznice Zapadnog Nila presudnu ulogu ima imunski sistem domaćina. Poznato je da starije jedinke i imunokompromitovane jedinke imaju veću predispoziciju za razvoj teške kliničke slike bolesti. Vremenski posmatrano posle prve nedelje od infekcije *WNV*, on se više ne može naći u krvi i perifernim organima. Ovaj vremenski period se pokapa sa nastankom simptoma oboljenja centralnog nervnog sistema (CNS) (Diamond et al., 2003).

2.5.1. Urođeni imunski odgovor domaćina na virus Zapadnog Nila

2.5.1.1. Urođeni imunski odgovor ćelija domaćina na virus Zapadnog Nila

U imunskom odgovoru ćelija domaćina na *WNV* odlučujuću ulogu u daljem razvoju infekcije imaju makrofagi. U radu Ben-Nathan i sar. objavljeno je da eliminacija makrofaga dovodi do produžene viremije, kao i do povećanog procenta razvoja encefalitisa i smrtnog ishoda kod eksperimentalnih miševa. Koristeći u eksperimentu soj *WNV* koji izaziva encefalitise i soj virusa koji nema neuroinvazivno dejstvo, dokazali su da uklanjanje makrofaga dovodi do povećanja smrtnosti kod miševa od 50-100% u slučaju infekcije sa niskom dozom neuroinvazivnog virusa, a da u slučaju infekcije sa virusom koji nema neuroinvazivno dejstvo nastaje produžena viremija, što omogućava ulazak virusa u CNS i razvoj kliničke slike (Ben-Nathan et al, 1996).

Makrofagi takođe imaju mogućnost produkcije azotnog oksida koji oštećuje virus (Kreil and Eibl, 1996).

Ćelije ubice (NK-natural killer cells) su populacija T limfocita koje imaju ulogu u uništavanju ćelija inficiranih sa virusima. Oni su nađeni u mozgu miševa koji su inficirani sa *WNV*, ali je takođe dokazano i da su inficirani astrociti rezistentni na dejstvo ćelija ubica. Tačni mehanizmi dejstva još uvek nisu poznati. (Liu and Mollbacher, 1988).

$\gamma\delta$ T limfociti imaju ulogu u ranom imunskom odgovoru na infekciju virusom zapadnog Nila i direktno ograničavaju infekciju. Oni reaguju direktno na virusni antigen, pošto za njihovu aktivaciju nije potreban put prezentiranja antigena (Carding and Egan, 2002).

2.5.1.2. Uloga sistema komplementa u odbrani od virusa Zapadnog Nila

Sistem komplementa predstavlja serumske proteine koji učestvuju u kaskadnim reakcijama koje imaju za cilj formiranje litičkog kompleksa i uništenje stranog agensa unutar ćelija. Postoje tri puta aktivacije komplementa: klasični, alternativni i lektinski. Sistem komplementa je neophodan u odbrani organizma od letalne infekcije *WNV* putem sva tri puta aktivacije (Mehlhof and Diamond, 2006).

2.5.1.3. Uloga interferona u odbrani od virusa Zapadnog Nila

Interferoni (IFN) su molekuli koje luče ćelije inficirane virusima. To je jedan od najvažnijih mehanizama urođenog imuniteta u odbrani od virusnih patogena. Postoje tri tipa interferona: tip I (IFN- α i IFN- β), tip II (IFN- γ) i tip III (IFN- λ).

Interferoni tipa I (IFN- α i IFN- β) kontrolišu primarnu infekciju sa *WNV*, ograničavaju tropizam virusa izvan nervnog sistema i time smanjuju stepen viremije i širenje virusa u CNS (Samuel and Diamond, 2005).

Tip II interferon (IFN- γ) proizvode ćelije ubice (NK), $\gamma\delta$ ćelije i CD8+ T limfociti. Ovaj interferon sprečava umnožavanje virusa preko nekoliko mehanizama: direktnom inhibicijom virusa, polarizacijom i aktivacijom T pomoćničkih ćelija, povećavanjem antigenske ekspresije glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC I) i aktivacijom fagocita. U nizu eksperimenata na miševima Shrestha i sar. su pokazali da nedostatak lučenja IFN- γ i signalizacije koju on proizvodi dovodi do povećanja smrtnosti miševa od 30% do 90% posle subkutane inokulacije i smanjenja prosečnog vremena preživljavanja posle infekcije sa *WNV* (Shrestha et al., 2006).

2.5.2. Stečeni imunski odgovor domaćina na virus Zapadnog Nila

2.5.2.1. Humoralni imunski odgovor na virus Zapadnog Nila

B limfociti i proizvodnja antitela protiv *WNV* imaju ključnu ulogu u odbrani organizma. U radu Diamond i sar. opisali su rezultate subkutane infekcije imunodeficientnih miševa C57BL/6 koji nisu imali B limfocite. Oni su zaključili da infekcija niskom dozom *WNV* dovodi do smrtnog ishoda i visokog titra virusa u krvnom serumu i CNS. Pasivnim transferom seruma imunih miševa zaključili su da antitela i B limfociti igraju kritičnu ulogu u imunskoj reakciji domaćina na *WNV* i ograničavanju viremije i širenja virusa ka CNS (Diamond et al., 2003a).

Imunoglobulini klase M (IgM) koji se izlučuju iz CD5+ B-1 limfocita predstavljaju prvu liniju odbrane od patogena. Oni dovode do direktne neutralizacije, pomažu fagocitozu i aktiviraju sistem komplementa. Odsustvo antigenom indukovane sinteze

IgM antitela dovodi do smrti i većeg stepena viremije. Utvrđeno je da specifična IgM antitela za *WNV* sprečavaju širenje virusa do perifernih nelimfatičnih organa i ograničavaju infekciju preko neutralizacije virusa do stvaranja imunoglobulina klase G (Diamond et al., 2003).

Imunoglobulini klase G (IgG) štite od dejstva *WNV* putem direktne neutralizacije receptora vezivanja, preko uništavanja virusa Fc receptor zavisnim putem, putem lize virusa ili inficiranih ćelija vezanim za komplement, i preko mehanizma citotoksičnosti posredovane antitelima.

Imunoglobulini klase M (IgM) se mogu naći u krvnom serumu već oko osmog dana po infekciji sa *WNV*. Ova se antitela zadržavaju oko dva meseca u krvotoku, a u pojedinim slučajevima mogu da se dokažu i 500 dana posle infekcije. Imunoglobulini klase G se pojavljuju kasnije od IgM antitela, a najveću koncentraciju dostižu oko treće i četvrte nedelje po infekciji, a često i ranije. Ova antitela mogu da se utvrde u krvnom serumu i posle 500 dana od infekcije (Roehrig et al., 2003).

2.5.2.2. Ćelijski imuni odgovor na virus Zapadnog Nila

Dokazano je da CD4⁺ T limfociti kontrolišu virusne infekcije putem nekoliko mehanizama: aktivacijom i povećavanjem B i T ćelijskog odgovora, stvaranjem medijatora inflamacije-citokina, direktnim citotoksičnim efektom i podsticanjem ćelija pamćenja. U radu Sitati i Diamond su ispitali reakciju miševa sa deficijencijom CD4⁺ T limfocita prema infekciji sa *WNV*. Zaključeno je da ovi miševi pokazuju produženo vreme infekcije CNS, što dovodi do uniformne smrtnosti do 50 dana posle infekcije. Dokazano je da CD4⁺ T limfociti održavaju proizvodnju antitela i CD8⁺ T limfocita koji brzo neutrališu virus. (Sitati and Diamond, 2006).

CD8⁺ T limfociti su efektorske ćelije koje sprečavaju perzistentnu infekciju u tkivima. U njihovom odsustvu zabeleženi su povećani titrovi virusa izolovanog iz CNS, povećana smrtnost miševa u eksperimentu, ali i normalan odgovor B limfocita koji su proizvodili antitela što dovodi do zaključka da je ova subpopulacija limfocita neophodna u trajnom uklanjanju virusa iz organizma (Shrestha and Diamond, 2004).

2.6. KLINIČKA SLIKA, PATOMORFOLOŠKI NALAZ I DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA GROZNICE ZAPADNOG NILA KOD LJUDI, KONJA I PASA

2.6.1. Definicija kliničkog slučaja groznice Zapadnog Nila kod ljudi

Groznica Zapadnog Nila, prema pravnoj regulativi Evropske Unije (Odluka Komisije 2009/312/EC) je bolest obavezna za prijavljivanje. Definicija kliničkog slučaja groznice Zapadnog Nila data je u Odluci komisije od 28.04.2008. godine (amandman odluke 2002/253/EC).

Uspostavljeni su sledeći kriterijumi:

A. Sigurno pozitivan slučaj:

1. Klinički kriterijumi za dijagnostiku groznice Zapadnog Nila:
 - meningitis
 - encefalitis
2. Laboratorijski kriterijumi:
 - Izolacija virusa iz krvi ili likvora
 - Detekcija nukleinske kiseline virusa u krvi ili likvoru
 - Prisustvo specifičnih IgM u likvoru
 - Visok titar specifičnih IgM antitela i detekcija specifičnih IgG uz potvrdu neutralizacijom.
3. Postoje i epidemiološki kriterijumi:
 - Transmisija bolesti od životinja na ljude - izlaganje komarcima u području gde postoje dokazi endemskog kruženja *WNV* kod konja i ptica.
 - Transmisija bolesti od čoveka na čoveka - vertikalna transmisija, transfuzije krvi, transplantacija organa.

B. Verovatan slučaj:

Uz kliničke simptome meningitisa ili encefalitisa potrebno je da postoji specifičan odgovor antitela u serumu, a da su zadovoljeni epidemiološki kriterijumi.

Klinički kriterijumi za dijagnostiku groznice Zapadnog Nila su nešto drugačiji u Sjedinjenim Američkim državama (CDC, 2013):

1. Klinički kriterijumi

1. Neuroinvazivno oboljenje:

- Groznica 38 °C i više
- Meningitis, encefalitis, akutna flacidna paraliza ili drugi akutni klinički simptomi centralnog ili perifernog neurološkog oboljenja
- Nepostojanje drugog kliničkog objašnjenja simptomatologije

2. Negativan slučaj neuroinvazivnog oboljenja:

- Groznica 38 °C i više
- Odsustvo neuroloških simptoma
- Nepostojanje drugog objašnjenja kliničkih simptoma.

2. Laboratorijski kriterijumi za dijagnozu groznice Zapadnog Nila

- Izolacija virusa ili dokazivanje specifične virusne *RNK* u tkivu, krvi, likvoru ili drugoj telesnoj tečnosti
- Četvorostruka ili veća razlika u titru specifičnih antitela u parnim krvnim serumima
- Prisustvo specifičnih IgM antitela uz potvrdu specifičnih neutralizujućih antitela u istom ili kasnijem uzorku krvnog seruma
- Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru i negativan rezultat prisustva drugih IgM antitela u likvoru za arboviruse koji su endemski u regionu.
- Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru ili serumu.

Klinički slučajevi se klasifikuju kao:

1. Potvrđeni slučaj neuroinvazivne bolesti: Kada postoje klinički simptomi neuroinvazivne bolesti i jedan ili više laboratorijskih kriterijuma za potvrđeni slučaj:

- Izolacija virusa ili potvrda prisustva specifičnog virusnog antigena ili nukleinske kiseline u tkivu, krvi, likvoru ili drugoj telesnoj tečnosti
- Četvorostuko povećanje ili veća razlika u titru specifičnih antitela u parnim krvnim serumima
- Prisustvo specifičnih IgM antitela uz potvrdu specifičnih neutralizujućih antitela u istom ili kasnijem uzorku krvnog seruma

-Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru i negativan rezultat prisustva drugih IgM antitela u likvoru za arboviruse koji su endemski u regionu

2. Potvrđen slučaj kod negativnog neuroinvazivnog oboljenja:

-Izolacija virusa ili potvrda prisustva specifičnog virusnog antigena ili nukleinske kiseline u tkivu, krvi, likvoru ili drugoj telesnoj tečnosti

-Četverostruka ili veća razlika u titru specifičnih antitela u parnim krvnim serumima

-Prisustvo specifičnih IgM antitela uz potvrdu specifičnih neutralizujućih antitela u istom ili kasnijem uzorku krvnog seruma

-Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru i negativan rezultat prisustva drugih IgM antitela u likvoru za arboviruse koji su endemski u regionu.

3. Verovatan slučaj neuroinvazivnog oboljenja:

-Potrebno je da budu zadovoljeni klinički kriterijumi prisustva neuroinvazivnog oboljenja i sledeći laboratorijski kriterijumi: Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru ili krvnom serumu bez rezultata daljih laboratorijskih testova.

4. Verovatan slučaj kod negativnog neuroinvazivnog oboljenja:

-Potrebno je da budu zadovoljeni klinički kriterijumi negativne neuroinvazivne bolesti i sledeći laboratorijski kriterijumi: Prisustvo specifičnih IgM antitela u likvoru ili krvnom serumu bez rezultata daljih laboratorijskih testova (CDC, 2013).

2.6.2. Definicija kliničkog slučaja groznice Zapadnog Nila kod konja

Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih američkih država definiše sledeće kriterijume za slučajevne infekcije *WNV* kod konja (USDA,2011).

Slučaj sumnje na infekciju sa *WNV* predstavlja životinja koja pokazuje simptome encefalomijelitisa i smeštena je ili je u skorije vreme boravila u području na kome su aktivni inficirani vektori.

Verovatni slučaj infekcije sa *WNV* je slučaj obolele životinje gde je prisustvo specifičnih antitela potvrđeno testom redukcije plakova (*PRNT*), a nema podataka o prethodnoj vakcinaciji životinje.

Povrđeni slučaj infekcije sa *WNV* zahteva prisustvo kliničke slike i ispunjenost jednog od sledećih kriterijuma:

1. Izolaciju virusa ili dokazivanje prisustva specifičnog antigena ili nukleotidne sekvence genoma virusa u tkivima, krvi, cerebrospinalnoj tečnosti ili drugim telesnim tečnostima
2. Dokazivanje specifičnih IgM antitela u krvnom serumu ili cerebrospinalnoj tečnosti metodom imunoenzimskog *capture ELISA* testa.
3. Četvorostuko ili veće povećanje titra IgG antitela metodom imunoenzimskog *capture ELISA* testa ili metodom redukcije plakova (*PRNT*) u uzorcima parnog krvnog seruma kod životinje koja nije vakcinisana.
4. Pozitivan imunohistohemijski nalaz virusnog antigena u tkivima. (USDA, 2011)

2.6.3. Klinička slika, patomorfološki nalaz i diferencijalna dijagnostika groznice Zapadnog Nila kod konja

Konji su izrazito prijemčiva životinjska vrsta za *WNV*. Inkubacioni period kod konja najčešće iznosi od 3 do 15 dana. Kao i druge vrste, konji mogu da obole inaparentno, gde kao rezultat infekcije nastaje serokonverzija. Životinje mogu da obole subklinički kada ispoljavaju simptome slične gripu. U teškim slučajevima (30-40% populacije) se razvijaju simptomi neuroinvazivne bolesti. Česti klinički simptomi koji se javljaju su: groznica, ataksija, slabost, poremećaj vida, besciljno lutanje, mišićni tremor, rigidnost ekstremiteta, hipersenzitivnost, nemogućnost gutanja, pareza kranijalnog nerva, a u teškim slučajevima nastupa encefalomijelitis, koma i letalan ishod (Ward et al, 2004).

U radu Cantile i sar. su opisali kliničku sliku i patomorfološke promene prilikom epizootije *WNV* u regiji Toskana severne Italije 1998. godine. Ukupno je obolelo 14 konja koji su pokazivali znake ataksije, slabosti, pareze zadnjih ekstremiteta. Kod 6 konja razvili su se znaci tetraplegije u periodu od 2. do 9. dana po pojavi kliničkih simptoma bolesti. Osmam životinja se oporavilo, 2 su uginule, dok je 4 konja humano

eutanazirano. Pri patomorfološkom pregledu uginulih životinja makroskopski nisu uočene bitne promene unutrašnjih organa i CNS. Pri patohistološkom pregledu postojali su znaci aseptičnog encefalomijelitisa. Lezije su se nalazile u predelu kičmene moždine i produžene moždine. Sastojale su se iz perivaskularnog nakupljanja limfoplazmatičnih ćelija, nakupljanja glija ćelija i fokalne glioze sive mase CNS. Kičmena moždina je bila promenjena u torakalnom i lumbalnom segmentu uz obostrana, simetrična oštećenja sive mase ventralnih i lateralnih rogova. Patohistološki, radilo se o aseptičnoj zapaljenskoj reakciji, neuralnoj degeneraciji uz prisustvo neutrofila. Zapažene su umerene lezije retikularne formacije ponsa i produžene moždine (*medulla oblongata*), a još manje lezija je bilo u talamusu i srednjem mozgu. Retko su uočeni zapaljenska reakcija i edem mozdanih ovojnica. Nisu uočene promene drugih unutrašnjih organa (Cantile et al., 2000).

Tokom epidemije groznice Zapadnog Nila u SAD 1999. godine praćeno je 20 konja sa simptomima oboljenja CNS uzrokovanog sa *WNV*. Primećeni su sledeći simptomi: ataksija, mišićni tremor, nemogućnost izbegavanja prepreka, nemogućnost stajanja na ekstremitetima. Uginula su četiri konja, a patohistološki nalaz je potvrdio prisustvo uzročnika u uzorcima kičmene moždine i moždanog tkiva (Trock et al., 2000).

Venter i sar. su ispitivali prisustvo neuroinvazivnog *WNV* linije 2 u populaciji konja u Južnoafričkoj Republici. Svi konji u čijim je uzorcima posle uginuća dokazano prisustvo *WNV* pre smrti su pokazivali simptome oboljenja CNS: ataksiju, slabost zadnjih i/ili prednji ekstremiteta, pareze ekstremiteta, paralizu, delimično slepilo, škripanje zubima, žuticu i miozu. Jedan konj je pokazivao simptome kvadriplegije, nekontrolisanog “veslanja” ekstremitetima, škripanja zuba i grčenja mišića. U pojedinim slučajevima je zabeležena intermitentna povišena temperatura. Patohistološkim pregledom uočeno je prisustvo antigena u lumbalnom delu kičmene moždine i pojedinim aksonima sive mase (Venter et al, 2009).

U diferencijalnoj dijagnostici treba uzeti u obzir sve bolesti kod kojih se javljaju nervni simptomi.

1. Besnilo,
2. Arbovirusne infekcije izazvane virusima iz familija *Flaviviridae* i *Togaviridae*,
3. Konjski herpesvirus 1 (EHV-1),
4. Protozoalne infekcije centralnog nervnog sistema,

5. Hepatička encefalopatija i poremećaji vezani za druge organske sisteme,
6. Toksikozе i botulizam,
7. Fokalne lezije kičmene moždine,
8. Wobblеrov sindrom i
9. Traume glave.

2.6.4. Klinička slika i patomorfološki nalaz groznice Zapadnog Nila kod pasa

Kada se razmatra pojava bolesti koju izaziva *WNV* kod pasa, mora se reći da su tek u skorije vreme zabeleženi slučajevi koji su imali tipičnu sliku neuroinvazivnog oboljenja koje izaziva ovaj virus u akutnom toku (Read et al., 2005; Lichtensteiger et al., 2003). Ranije se smatralo da virus izaziva subkliničku infekciju iz koje ostaju antitela koja se detektuju u krvnom serumu pasa, ali se olako odbacivala mogućnost razvoja kliničke slike (Austgen et al., 2004). Danas se zna da *WNV* može da izazove neuroinvazivnu bolest sa letalnim ishodom. Kao što je već navedeno u kliničkoj slici groznice Zapadnog Nila dominantno je progresivno nervno oboljenje u akutnoj fazi bolesti. Prethodno u fazi viremije koja traje oko 4-5 dana po infekciji dolazi do pojave opšteg infektivnog sindroma koji je praćen apatijom, odusustvom želje za hranom i povišenom telesnom temperaturom. U većini akutnih slučajeva životinja ne može da stane na zadnje noge, pokazuje znake ataksije, a u kasnijoj fazi bolesti dolazi i do pojave generalizovanih tremora. Ovakve životinje najčešće uginu ili bivaju eutanazirane. Zabeleženi su i slučajevi miokarditisa, kao i nefropatije, uvećanja slezine i jetre (Lichtensteiger et al., 2003).

Prvi slučajevi izolacije *WNV* su prijavljeni kod psa sa simptomima encefalitisa u Africi (Simpson and Kuebart, 1979). Više podataka o pojavi groznice Zapadnog Nila kod pasa se pojavilo u toku epidemije koja je 1999. godine zahvatila SAD. U novembru 2002. godine zabeležen je slučaj pojave bolesti kod dvogodišnjeg malteškog terijera u centralnom Misisipiju, SAD. Pas je primljen na pregled kod veterinara sa simptomima hipersenzitivnosti koja se ubrzo pretvorila u generalizovane tremore, ataksiju koje je pratila intermitenta hipertermija. Posle 2 nedelje pas je uginuo, a patomorfološki nalaz je pokazao blagi, multifokalni, aseptični meningoencefalitis praćen fokalnim nekrozama

u kičmenoj moždini. Virus groznice Zapadnog Nila je potvrđen PCR reakcijom (Read et al., 2005). U radu Lichensteiger i sar. opisani su slučajevi *WNV* kod psa i vuka. Pas je bio osam godina star, dok je vuk imao 3 meseca. Vuk je uginuo posle 2 dana uz simptome letargije, depresije, anoreksije, opšte slabosti, ataksije i slepila. Pas je eutanaziran posle sedmog dana bolesti. Uočeni su sledeći klinički simptomi: letargija, anoreksija, polidipsija, iscedak iz ociju, vodenasta dijareja, abdominalni bol. Posle blagog poboljšanja opšteg stanja nakon tri dana pojavili su se simptomi dispneje, dijareje sa melenom, ataksije, nepravilnosti držanja glave, plućnog edema i srčanih aritmija. U laboratorijskom nalazu krvi uočeni su: blaga anemija, trombocitopenija, leukocitoza sa neutrofilijom, umerena hipokalemija, hipoglikemija i hipoproteinemija. Patohistološkim pregledom uočene su promene sive mase svih moždanih delova, nakupljanje mikroglia ćelija i limfocita, nekroza neurona. Bela masa je sadržala nodule glija ćelija. Postojala su oštećenja miokarda, a manje promene su uočene u isečcima skeletnih mišića i nadbubrežne žlezde. U slučaju psa, patomorfološki nalaz je pokazao fibrozni epikarditis, hepatopatiju, plućni edem, akutne infarkte slezine. Patohistološki nalaz je pokazao polioencefalitis, miokarditis sa nekrozom ćelija miokarda, limfocitne infiltrate. Promene na plućima i jetri su bile posledica prestanka rada srca. (Lichensteiger et al., 2003). Rad Buckweitz i sar. je naročito interesantan, jer prijavljuje slučaj starijeg psa koji je imao simptome encefalitisa i miozitisa. Pas nije mogao da ustane na noge čak i kada su ga pridržavali. Nije imao mogućnost kontrole zadnjih ekstremiteta, imao je izmenjenu svest i temperaturu 40.3 °C i uvećanu prostatu. Pas je eutanaziran, a patomorfološki nalaz je obuhvatio ankilozni spondiloartritis, benigni tumor testisa, hiperplaziju prostate, oštećenja na *a.pulmonalis* i *E.coli* u urinu. Histološkim pregledom mozga otkriveni su mikroglialni noduli i inflamatorna žarišta. Brojna žarišta su pronađena i u bubrezima. Imunohistohemijskim bojenjima je dokazano prisustvo *WNV* u promenjenim organima. Primećena su i mala, nepravilna područja nekroze miokarda srca u kojima je takođe dokazan virus. Značaj ovog rada je u dokazu velike količine virusa u bubrezima, što je bilo iznenađujuće, ali je doprinelo mišljenju da se biopsija bubrega može koristiti u dijagnostici za života životinje, a postmortalno bubrezi mogu biti dobri organi za dokaz virusa *PCR* tehnikom ili imunohistohemijskim metodama (Buckweitz et al., 2003). Bodewes i sar. navode *WNV*

kao uzročnika progresivnog neurološkog oboljenja i subkliničke infekcije pasa (Bodewes et al, .2009).

2.6.5. Klinička slika i patomorfološki nalaz groznice Zapadnog Nila kod ljudi

Većina osoba (80-90%) inficiranih virusom Zapadnog Nila nema nikave simptome ili znake bolesti. Kod malog procenta inficiranih osoba (10-20%), posle inkubacionog perioda od 3 do 6 dana moguća je pojava bolesti slične gripu. Ovakva klinička forma bolesti se karakteriše sledećim simptomima: umereno ili veliko povećanje telesne temperature koje traje 3 do 5 dana, makulopapulozni osip ili osip u obliku rozeola u otprilike 50% slučajeva koji se širi od tela ka ekstremitetima i glavi. Javljaju se limfadenopatija, anoreksija, povraćanje, abdominalni bol, dijareja, miozitis, orhitis i respiratorni simptomi. Retko se javljaju hepatosplenomegalija, hepatitis, pankreatitis, miokarditis i hemoragična groznica. Kod pojedinih osoba javljaju se simptomi neuroinvazivne bolesti- aseptični meningitis ili encefalitis, akutna flacidna paraliza. Klinička slika neuroinvazivnog oboljenja kod ljudi obuhvata povišenu telesnu temperaturu iznad 37.5 °C, glavobolju, ukočenost vrata, dezorijentisanost, konvulzije, slabost mišića, tremor, paralizu, komu. Letalitet je veći kod starijih osoba, naročito iznad 75 godina života (Batut, 2014).

Popović i sar. opisuju kliničku sliku kod pacijenata za vreme prve epidemije groznice Zapadnog Nila u Republici Srbiji 2012. godine. Od 58 pacijenata koji su zadovoljavali dijagnostičke kriterijume (45 potvrđenih slučajeva i 13 verovatnih slučajeva groznice Zapadnog Nila), 52 pacijenta je imalo simptome neuroinvazivne bolesti, dok je 6 pacijenata pokazivalo simptome blage febrilne bolesti. Od ovih šest pacijenata 3 je imalo groznicu i makulopapulozni osip, jedan pacijent je imao simptome pneumonije i dva su imala dugotrajno febrilno stanje sa intenzivnim bolom u mišićima (mijalgija). Od 52 pacijenta sa simptomima neuroinvazivne bolesti 44 je imalo encefalitis, a 8 meningitis. Od pacijenta sa encefalitisom 10 je pokazivalo znake ataksije i nemogućnosti kontrole normalnih mišićnih pokreta, a 13 je imalo akutnu flacidnu paralizu koja je zahvatala jedan ili više ekstremiteta (Popović et al., 2013).

Guarner i sar. opisuju rezultate patohistološkog nalaza nervnog tkiva pacijenata umrlih od *WNV*. Primećene su nakupine glija ćelija sa gubitkom neurona i perivaskularnim nakupljanjem mononuklearnih ćelija kod svih 23 preminulih pacijenata. Inflamacija i gubitak neurona su bili najuočljiviji u sivoj masi produžene moždine, ponsa i srednjeg mozga. Mesta inflamacije nisu pokazivala pravilnost u prostornom rasporedu. U uzorcima kičmene moždine uočeni su znaci inflamacije. Limfocitini neuritis kranijalnog ili spinalnih nerava je bio prisutan u 22% ispitivanih pacijenata (Guarner et al, 2004).

2.7. EPIDEMIOLOŠKA I EPIZOOTIOLOŠKA SLIKA VIRUSA ZAPADNOG NILA

2.7.1. Epidemiološka i epizootiološka slika groznice Zapadnog Nila u svetu do 2010. godine

Od 1937. godine kada je *WNV* po prvi put izolovan u Ugandi, do danas on je postao globalno rasprostranjen i jedino nije zabeležen na Antartiku. Sa pojavom epidemije i epizootije *WNV* u SAD 1999. godine, on se velikom brznom raširio po Severno Američkom kontinentu gde pre toga nije bio prisutan (Lanciotti et al, 1999) i tako postao prvi virus „starog sveta“ koji se pojavio u SAD.

Ubrzo po objavljivanju prvih podataka o virusu posle izolacije tokom 1940. godine, usledili su i izvestaji o aktivnosti *WNV* i na drugim lokalitetima pretežno afričkog kontinenta. Smatralo se da je virus endemski prisutan na određenim lokalitetima i da sporadično izaziva epidemije i epizootije kojima se nije pridavao veći značaj.

Prve velike epidemije su zabeležene u Izraelu 1950-53 i 1957. Bernkopf i sar. navode da je *WNV* prvi put izolovan u Izraelu 1951. godine iz krvi obolelog deteta tokom epidemije koja je trajala od jula do početka oktobra meseca blizu grada Haife. Obolelo je ukupno 123 osobe od kojih su najviše bila pogođena deca (Bernkopf et al., 1953). Prilikom epidemije 1957. godine opisana je klinička slika teškog neuroinvazivnog oboljenja i primećena je veza između starosti obolelih i težine kliničke slike (Chowers et al., 2001).

Prva istraživanja u delti reke Nil u Egiptu sprovedena su u periodu od 1952. do 1954. kada su utvđene prve epidemiološke karakteristike *WNV* (Taylor et al., 1956). Primećeno je da su letnji meseci od juna do septembra, periodi najintenzivnijeg širenja infekcije. Serološkim ispitivanjima je utvrđeno da seroprevalencija raste od 50% kod dece uzrasta od 4 godine do 90% kod osoba uzrasta od 20 godina, kao i da seroprevalencija raste od početka sezone transmisije do njenog kraja. Pokazano je da su faktori koji dovode do veće seroprevalencije upravo gustina populacije, blizina površina pod vodom i brojnost populacije vektora. Prvi put je ukazano na ulogu divljih ptica kao pravih domaćina *WNV* (Work et al., 1955). U ovom periodu se došlo do prvih podataka o uticaju *WNV* na pojedine životinjske vrste. Istraživanjima tokom 1959. godine obuhvaćeno je ukupno 400 konja kada je zabeležena *WNV* seroprevalencija od 54%. Takođe je potvrđena smrt jednog konja od *WNV* izolacijom iz tkiva mozga (Schmidt and El Mansoury, 1963). Ovo su prvi podaci o dejstvu *WNV* na ekvide.

Najveća zabeležena epidemija groznice Zapadnog Nila je bila 1974. godine u Južnoafričkoj Republici kada je obolelo 18000 ljudi, ali nisu bili zabeleženi smrtni ishodi. Virus Zapadnog Nila je tada bio izolovan iz uzoraka 6 obolelih ljudi, a interesantno je da je paralelno sa epidemijom groznice Zapadnog Nila izbila i epidemija Sindbis virusa koga takođe prenose isti vektori. Posle epidemije u populaciji ljudi je ustanovljena seroprevalencija od 55% na *WNV* (McIntosh et al., 1976).

Virus zapadnog Nila se sporadično pojavljivao i u Evropi. Tako prvi zabeleženi slučajevi prisustva specifičnih antitela za *WNV* u Evropi datiraju od 1958. godine kod 2 čoveka iz Albanije (Bárdoš et al., 1959).

Virus zapadnog Nila se pojavio 1962. godine u nacionalnom parku Camargue na jugu Francuske koji je poznat kao močvarno područje sa velikim brojem vrsta ptica selica koje migriraju od Evrope ka Africi i suprotno, kao i značajnoj populaciji divljih konja. Oboleli su ljudi, a od 80 konja koji su ispoljili neurološke simptome bolesti uginulo je oko 30% (Panthier et al., 1968, Joubert et al., 1970).

Prvi evropski izolati *WNV* potiču iz 1963. godine, kada je virus izolovan iz komaraca i ljudi u delti reke Rone (Hannoun et al., 1964.), kao i iz ljudi i krpelja (*Hyalomma marginatum*) u delti reke Volge (Chumakov et al., 1964).

U Republici Srbiji prvi podaci o zastupljenosti specifičnih antitela za *WNV* datiraju iz 1972. godine kada su Borđoški i saradnici zabeležili prisustvo antitela u pojedinim

regionima od 0 do 19.3% (Borđoški et al., 1972). Ispitivanja su rađena na uzorcima krvnih seruma klinički zdravih ljudi metodom inhibicije hemaglutinacije u periodu od 1962. do 1969. godine. Najveća seroprevalencija je zabeležena u regionu zapadne Srbije (okolina Užica) 19,4%, sledio je region centralne Srbije (Kraljevo, Ivanjica) sa 7,9%, grada Beograda sa 7,3%, Banata 4,7%, Kosova 2,7%, Srema sa 2,6%, istočne Srbije 1,2%, dok specifična antitela nisu zabeležena u regionu Sandžaka oko Novog Pazara.

Virus Zapadnog Nila je izazivao epidemije i epizootije u nizu mediteranskih zemalja (Alžir, 1994., Maroko 1996., Tunis 1997, Izrael 1998. i 2000. godine), dok su na teritoriji Evrope, između ostalih, zabeležene pojave epidemija groznice Zapadnog Nila u Rumuniji, 1996., Italiji 1998. godine, Rusiji 1999. i Francuskoj 2000. godine (Murgue et al., 2001). Sa pojavom epidemije u SAD 1999. godine *WNV* je postao prvi virus “starog sveta” koji se pojavio u “novom”. Virus se potom brzo proširio kako na Kanadu tako i na zemlje srednje Amerike (Lanciotti et al., 1999).

U Rumuniji je 1996. godine izbila prva velika epidemija groznice Zapadnog Nila na području Evrope. Od jula do oktobra meseca zabeleženo je ukupno 393 pacijenta sa serološki potvrđenim prisustvom specifičnih antitela za *WNV* ili verovatnih slučajeva groznice Zapadnog Nila. Akutnu infekciju centralnog nervnog sistema je imalo 352 pacijenta. Zabeleženo je 17 smrtnih ishoda kod pacijenata koji su bili stariji od 50 godina. Epidemija je zahvatila 14 distrikta u blizini reke Dunav, među kojima je bio i Bukurešt (Tsai et al., 1998). Tokom oktobra meseca sprovedena su ispitivanja u kojima je izolovan *WNV* (RO97-50) iz pula komaraca *Culex pipiens pipiens*. Ovaj virus je pripadao liniji 1 i smatra se da je u Evropu stigao putem migracije ptica iz Afrike (identična sekvenca sa virusom izolovanim u Keniji i Senegal) (Savage et al., 1999).

U Italiji groznica Zapadnog Nila izbija 1998. godine u severnom delu zemlje u regiji Toskana kada je obolelo 14 konja. Svi slučajevi su zabeleženi u periodu od avgusta do oktobra meseca. Serološki je *WNV* potvrđen u svih 14 slučajeva, a postmortalni pregled je obavljen kod 6 životinja. Virus je izolovan iz malog mozga jednog konja (Cantile et al., 2000).

Platonov navodi da velika epidemija *WNV* koja je počela u julu 1999. godine i zahvatila južnu Rusiju (region Volgograda) nije bila prepoznata od početka. U septembru mesecu kada je uzročnik epidemije prepoznat već je bilo hospitalizovano preko 400 ljudi. Ukupno je hospitalizovano 942 ljudi od kojih je kod 394 potvrđena

infekcija sa *WNV*. Tokom epidemije, 40 pacijenata sa simptomima akutnog aseptičnog meningoencefalitisa je umrlo. Zabeležena je izolacija dva soja virusa, jednog koji je izazvao epidemiju ograničenu na region Volgograda, a drugi je izolovan iz pacijenta koji je oboleo u regionu Astrakhana u kome je takođe zabeležena epidemija sa 89 obolelih i 5 smrtnih slučajeva. Još jedno žarište je postojalo u regionu Krasnodara gde je bilo 38 slučajeva groznice Zapadnog Nila i 3 smrtna ishoda. Molekularnom analizom utvrđeno je da izolat iz Volgograda pokazuje visok stepen homologije sa izolatom iz epidemije koja je 1996. godine zahvatila Rumuniju (RO97-50), zatim i sa izolatom koji je izazvao veliku epidemiju u SAD 1999. godine, kao i izolatom iz komaraca iz Kenije. Ovi virusi su pripadali liniji 1. Pretpostavlja se da je virus dospelo putem migracije ptica, pošto se južni deo Rusije nalazi na migracionoj ruti ptica iz Kenije. Retrospektivnom analizom podataka o broju zabeleženih bakterijskih meningitisa tokom 1997. i 1998. godine primećeno je da je stopa umrlih koji su stariji od 60 godina viša nego što bi bilo očekivano kod bakterijskog uzročnika. Primećeno je i da je tokom jula i avgusta meseca 1997. godine u Volgogradu zabeleženo 128 slučajeva akutnog seroznog meningitisa, gde je 112 slučajeva ostalo bez etiološke dijagnoze. Tokom 1998. godine broj obolelih od meningitisa bez etiološke dijagnoze je iznosio 68 pacijenata. Platonov zaključuje da su postojali pokazatelji prisustva *WNV* i pre izbijanja epidemije 1999. godine (Platonov, 2001).

Murgue i sar. opisuju ponovnu pojavu *WNV* u Francuskoj 2000. godine posle poslednjih zabeleženih slučajeva uginuća kod konja i izolacije virusa iz mozga konja i pula komaraca 1965. godine. I ovog puta obolele životinje su se nalazile na jugu Francuske u regiji Hérault, koja je dobro poznata po močvarama i kolonijama ptica selica i stanarica. Obolela su tri konja sa simptomima akutnog neurološkog oboljenja, groznicom, parezom zadnjih ekstremiteta, od kojih je jedan uginuo a preostala dva su eutanazirana. Serološkim ispitivanjima kasnije tokom iste godine zabeleženo je 58 potvrđenih slučajeva *WNV* kod ekvida (konji i jedan magarac) i 18 verovatnih slučajeva groznice Zapadnog Nila. Uginulo je 20 životinja sa potvrđenom dijagnozom i jedna sa verovatnom dijagnozom groznice Zapadnog Nila. Nisu zabeleženi slučajevi bolesti kod ljudi. Filogenetskom analizom gena glikoproteina E izolat iz konja WN France-2000 svrstan je u liniju 1 i blisko je povezan sa izolatima iz Italije iz 1998. i Maroka 1996, Rumunije 1996., Senegala i Kenije (Murgue et al., 2001a).

U Nju Jorku 1999. godine počinje epidemija *WNV* koja je prema mnogim epidemiološkim osobinama bila veoma specifična. Već početkom juna meseca 1999. godine došlo je do povećanog broja uginulih ptica- vrana iz familije *Corvidae* na teritoriji grada Nju Jorka. Obolevanje ljudi u avgustu mesecu nije u prvo vreme identifikovano kao epidemija sa istim uzročnikom. Primećen je veliki broj obolelih (59) sa simptomima meningoencefalitisa od kojih je sedam pacijenata umrlo. Laboratorijskim ispitivanjima je zaključeno da je sličan virusu Sent Luis encefalitisa, pretpostavka je bila da se radilo o Kunjin virusu, dok Centar za kontrolu bolesti u Atlanti 23. septembra nije objavio da se radi o *WNV* linije 1 - (CDC, 1999; Campbell et al., 2002; Lanciotti et al.,1999.). Smatra se da je uzročnik - izolovani virus linije 1, na teritoriju SAD dospeo nekoliko godina ranije najverovatnije putem avionskog transporta, gde se pritajeno održavao u populaciji ptica. Virus se brzo proširio na celu teritoriju SAD, gde je izazvao obolevanje velikog broja ljudi, pomor prijemčivih ptica (111 vrsta je dokazano kao prijemčivo za infekciju virusom Zapadnog Nila na teritoriji severne Amerike), konja i drugih vrsta životinja, kao i velike ekonomske štete (Campbell et al,2002). Dokazani su efekti unošenja novog virusnog agensa u populaciju neimunih organizama, kao i sposobnost arbovirusa da postanu endemski prisutni unošenjem na teritoriju gde postoje vektori i pravi domaćini u kojima će se virus razmnožavati.

Virus je ubrzo dokazan u Kanadi gde je takođe izazivao epidemiju sa velikim brojem obolelih ljudi. Zatim se pojavljuje u Meksiku i na Karibskim ostrvima, da bi se do danas proširio i na južnu Ameriku (Komar and Clark, 2006).

U Evropi 2004. godine dolazi do prve zabeležene pojave *WNV* linije 2 prilikom uginuća ptice grabljivice (jastreb- *Accipiter gentilis*) u Mađarskoj (Bakonyi et al., 2006a). Ovom prilikom je još jednom dokazano da se virus širi putem migracije ptica. Od ovog trenutka u Evropi dokazano cirkuliše i virus linije 2 koji potom izaziva velike epidemije kod ljudi poslednjih godina.

2.7.2. Epizootiološka situacija za groznicu Zapadnog Nila u Evropi posle 2000. godine

Podaci o izbijanju groznice Zapadnog Nila u Evropi kod životinja su uglavnom vezani za konje, kao životinjsku vrstu koja najčešće pokazuje znake neuroinvazivne bolesti. U Evropi su zabeleženi i slučajevi bolesti kod drugih životinjskih vrsta (ovce, ptice). Veliki broj evropskih zemalja je sproveo opširan monitoring prisustva specifičnih antitela u populacijama divljih ptica, sentinel vrsta i komaraca kao vektora *WNV*. Podaci o seroprevalenciji su značajni pokazatelji pojave virusa kod ljudi i aktivnosti virusa u prirodnim žarištima. Bitni podaci o seroprevalenciji i pojavi infekcije sa *WNV* su prikazani po izabranim pojedinim zemljama.

Hrvatska. Barbić i sar. prikazuje podatke o seroprevalenciji specifičnih antitela za *WNV* u populaciji konja i goveda tokom 2010. i 2011. godine primenom kompetitivnog ELISA testa. Utvđena je seroprevalencija od 3.43% u populaciji konja (2098) i 0.11% u populaciji goveda (2695) (Barbić et al. 2012).

U avgustu 2012. godine Hrvatska prijavljuje prve slučajeve infekcije sa *WNV* kod šest konja na teritoriji Vukovarsko-Sremskog okruga blizu granice sa Republikom Srbijom, do kraja godine taj broj je porastao na 12 konja bez smrtnih ishoda (www.oie.int).

U julu 2014. godine Hrvatska ponovo prijavljuje slučaj obolelog konja ovaj put u Osječko-Baranjskom okrugu (www.oie.int).

Turska. Ozgul i sar. navode da je u 10 reprezentivnih provincija u Turskoj 2005. godine zabeležena sledeća seroprevalencija: 2,5% (1 od 40 testiranih) kod magaraca, 4% (4 od 100 testiranih) kod goveda, 37,7% (43 od 114 testiranih) kod pasa, 13,5% (35 od 259 testiranih) kod konja i 1% (1 od 100 testiranih uzoraka) kod ovaca (Ozgul et al., 2006).

Ozgul i sar. 2011. godine prikazuju prve podatke o izolaciji virusa linije 1 kod dva konja starih 8 i 9 meseci posle pojave neuroloških simptoma. Konji su se u potpunosti oporavili, a virus je izolovan iz krvi. Po pojavi bolesti sproveden je skrining u populaciji konja iste oblasti i ustanovljena je seroprevalencija od 31,6% (Ozgul et al., 2013).

Madarska. Erdelyi i sar. navode da je tokom leta 2004 i 2005. godine *WNV* linije 2 izazvao encephalitis usled koga su uginuli jastrebovi vrsta *Accipiter nisus* i *Accipiter*

gentilis. Ovo je bio prvi dokumentovan slučaj neuroinvazivne bolesti usled *WNV* linije 2 i prvi dokaz o cirkulaciji ovog virusa na kontinentalnom delu Evrope (Erdelyi et al., 2007).

Glavits i sar. opisali su simultanu pojavu cirkovirusa i *WNV* linije 1 u jatu gusaka starih 6 nedelja 2005. godine. Guske su pokazivale znake ataksije, intermitentnog tortikolisa i opistotonusa, nekoordinisane pokrete, ritmičke pokrete glave u stranu, abnormalan položaj držanja glave. Smrtni ishodi su primećeni 4 do 5 dana po pojavi kliničke slike. Prosečna smrtnost je iznosila od 5 do 15% na dan u periodu od 6 nedelja. Autori napominju da je prvi put *WNV* zabeležen kod gusaka u Mađarskoj 2003. godine (Glavits et al., 2005).

Kutasi i sar. opisali su prvu pojavu encefalitisa kod konja izazvanog sa linijom 2 *WNV* 2008. godine. Ukupno je obolelo 17 konja sa simptomima bolesti centralnog nervnog sistema. Preživelo je 70% obolelih životinja. Epizootija nije bila prostorno ograničena. Autori navode da iako je virus linije 1 dugo prisutan u cirkulaciji u Mađarskoj nije izazivao epizootije kod konja. Oni takođe navode da se pre 2008. godine *WNV* pojavljivao na istim močvarnim područjima, da bi se tokom 2008. godine naglo proširio na celu teritoriju Mađarske. Paralelno sa pojavom kliničke slike kod konja, virus se javio i u populaciji ptica grabljivica i ljudi sa najvećom incidencom u okolini Budimpešte (Kutasi et al., 2011).

Bakonyi i sar. naveli su da je od 2004. godine kada je *WNV* linije 2 prvi put dokumentovan u Mađarskoj i Evropi on postao endemski. U periodu od 2004. do 2007. godine izazivao je sporadične slučajeve bolesti. Došlo je do brzog širenja virusa kada je on dijagnostifikovan kod uginulih ptica grabljivica, konja i ljudi u 2008. godini. Autori navode da se virus proširio na istočni deo Austrije (Bakonyi i sar., 2013).

Austrija. Wodak i sar. navode da je 2008. godine potvrđeno šest slučajeva uginuća ptica grabljivica (pet jastreba vrste *Accipiter gentilis*, jedan vrste *Falco rusticolus*) koji su pronađeni na istoku Austrije. Virus je izolovan, a molekularna analiza je pokazala da se radi o virusu linije 2 koji je pokazao 99.9% sličnosti sa virusom izolovanim u Mađarskoj 2004. godine. Izvršeno je serološko ispitivanje prisustva specifičnih antitela za *WNV* na uzorku od 71 krvnog seruma 14 različitih vrsta ptica upotrebom komercijalnog ELISA testa gde su rezultati pokazali da 43,7% ptica poseduje specifična antitela za *WNV* (Wodak et al., 2011).

Italija. U Italiji je 2008. godine zabeležena epizootija *WNV* kod konja koja je počela u regiji Emilia-Romagna. Ova regija je poznata po močvarama, ali i razvijenom konjarstvu. Do 22. septembra prijavljeno je 12 potencijalnih slučajeva bolesti centralnog nervnog sistema kod konja izazvanih sa *WNV*. Laboratorijski je potvrđeno 6 slučajeva, 5 konja je imalo specifična antitela za *WNV*, dok je jedan konj imao negativne serološke rezultate. U radu se navodi da je *WNV* prethodno primećen u populaciji divljih ptica u toj regiji bez pojave povećanog mortaliteta (Macini et al., 2008).

Calistri i sar. navode da je do 31. decembra 2008. godine *WNV* identifikovan kao uzročnik bolesti konja u 3 regiona severne Italije (Emilia-Romagna, Veneto i Lombardija), gde je ukupno detektovano 794 slučajeva infekcije *WNV* u 251 različite štale. Samo 32 (4%) serološki pozitivnih životinja je pokazalo kliničke znake bolesti, a oni su poticali iz 18 različitih ergela. Stopa mortaliteta je iznosila 15.6% (5/32). Autori navode da je značajna seroprevalencija utvrđena kod ptica (Calistri et al., 2010).

Tokom 2010. godine *WNV* je izazvao epidemiju na jugu Italije, kada je obolelo 4 (www.oie.int), pa 5 (www.oie.int), pa potom i 18 konja u regionima Sicilije i Molisea (www.oie.int), pri čemu je taj broj porastao na 98 zabeleženih slučajeva sa jednim uginućem do kraja 2010. godine (www.oie.int).

Tokom 2011. godine *WNV* je registrovan na Sardiniji (gde je zabeleženo 61 slučajeva kod konja sa 10 smrtnih ishoda do aprila 2012), Calabriji, Friuli-Venezia Giulia, Basilicata, Veneto, Umbria (gde je zabeleženo 77 slučajeva sa 1 smrtnim ishodom kod konja) (www.oie.int). Monaco i sar. navode da je ovo bio prvi put da se *WNV* linije 1 proširio na Sardiniju. Ovaj virus je svrstan u poseban pod-klastar, ali nije primećena povezanost između virulencije virusa i nešto različitog genotipa (Monaco et al., 2015).

U leto 2013. godine zabeležena je ponovna pojava *WNV* u regionu Lombardije na severu Italije kod konja u 11 slučajeva, a otkrivena je i jedna obolela vrana (Rovida et al., 2015).

Francuska. Prema podacima OIE u Francuskoj su registrovane epizootije 2003, 2004. i 2006. godine. Mailles i sar. obaveštavaju o izbijanju groznice Zapadnog Nila kod ljudi i konja u regiji Var kada je u toku 5 nedelja od sredine septembra meseca obolelo 2 čoveka sa simptomima encefalitisa i 3 konja od koji je jedan eutanaziran (Mailles et al., 2003). Zeller i sar. navode da je 2004. godine izbila groznica Zapadnog

Nila kod konja u regiji Camargue na jugu Francuske kada je do kraja septembra meseca bilo 37 slučajeva sumnje na infekciju sa *WNV*, a 4 konja je eutanazirano. U epizootiji 2006. godine je prijavljena groznica Zapadnog Nila kod 4 konja od kojih je jedan uginuo (Zeller et al., 2004).

Grčka. Tokom epidemije *WNV* kod ljudi koja je izbila u period jul—avgust 2010, u avgustu mesecu je evidentirana i pojava bolesti kod šest konja u regiji Makedonija. Do kraja septembra meseca broj obolelih je porastao na 13 slučajeva od kojih su dva konja uginula. U oktobru mesecu je prijavljeno još 18 slučajeva sa tri smrtna ishoda, dok je potom taj broj porastao na 30 slučajeva bolesti izazvane sa *WNV*. Do avgusta 2011. godine prijavljeno je 39 slučajeva sa tri smrtna ishoda. Do kraja ove epidemije do juna 2012. godine prijavljeno je ukupno 53 slučaja oboljenja kod konja sa četiri smrtna ishoda.

U julu 2012. godine *WNV* opet izbija kao posebna epizootija sa jednim slučajem u regiji Anatoliki Makedonia Kai Thraki, a taj broj raste na 15 slučajeva do kraja 2012. godine. U julu 2013. godine ukupno je zabeleženo 17 slučajeva prostorno rasprostranjenih po skoro celoj teritoriji Grčke, a do prestanka epizootije u julu 2014. godine registrovano je 30 slučajeva kod konja sa jednim smrtnim ishodom (www.oie.int).

Španija. U septembru 2010. godine prijavljen je slučaj groznice Zapadnog Nila na području Andaluzije kod dva konja, da bi taj broj potom porastao na 39 konja sa dva smrtna ishoda (www.oie.int).

Tokom 2011. godine zabeleženo je 11 slučajeva sa jednim smrtnim ishodom (www.oie.int).

Bugarska. U oktobru mesecu 2010. godine prijavljeno je pojava groznice Zapadnog Nila kod pet konja u Dobrich distriktu, potom i kod tri konja na teritoriji Varne (www.oie.int).

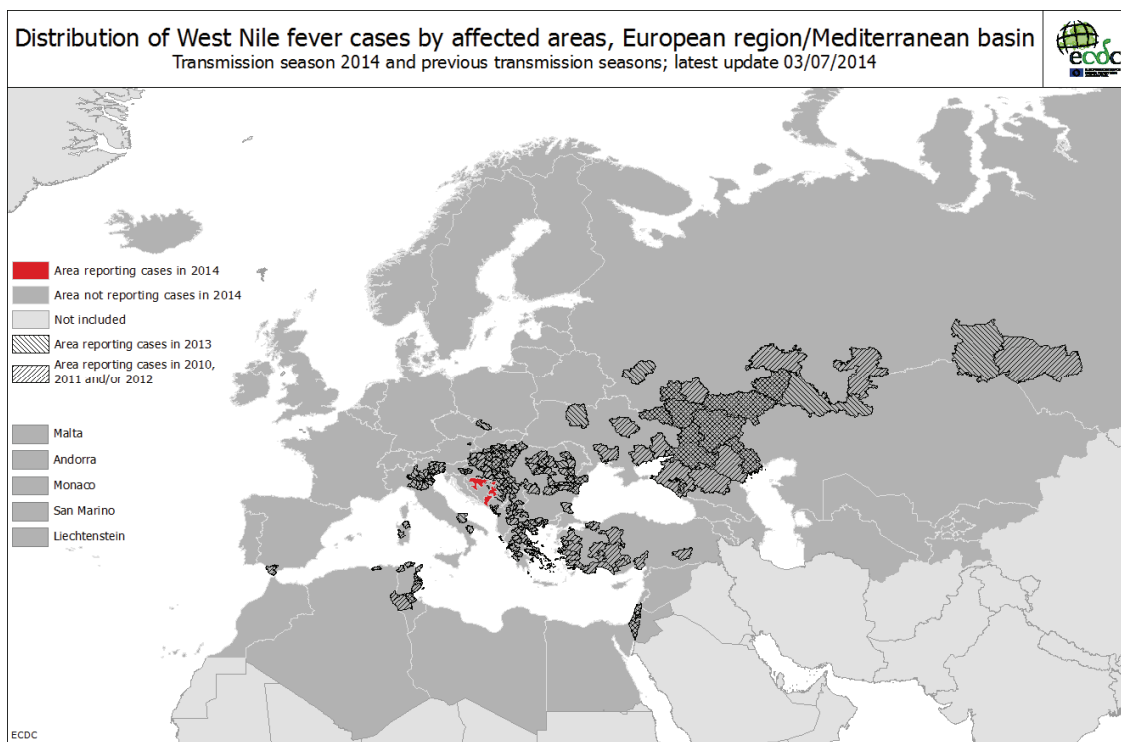
Rumunija. U novembru mesecu 2010. godine zabeležena je pojava *WNV* kod šest konja koji su bili u blizini močvarnih područja (www.oie.int).

Portugal. U oktobru 2010. godine zabeležena je pojava *WNV* kod dva konja u regionu Lisabona (www.oie.int).

Makedonija. Makedonija prijavljuje 2011. godine prve slučajeve infekcije sa *WNV* kod 10 konja i 36 ptica u regiji Skoplja i Negotinoa (www.oie.int).

Bosna i Hercegovina. Bosna i Hercegovina prvi put prijavljuje uginuće dve vrane (*Corvus cornix*) u septembru mesecu 2013. godine na području Sarajeva i Tuzle (www.oie.int).

2.7.3. Epidemiološka situacija groznice Zapadnog Nila u Evropi od 2010. godine



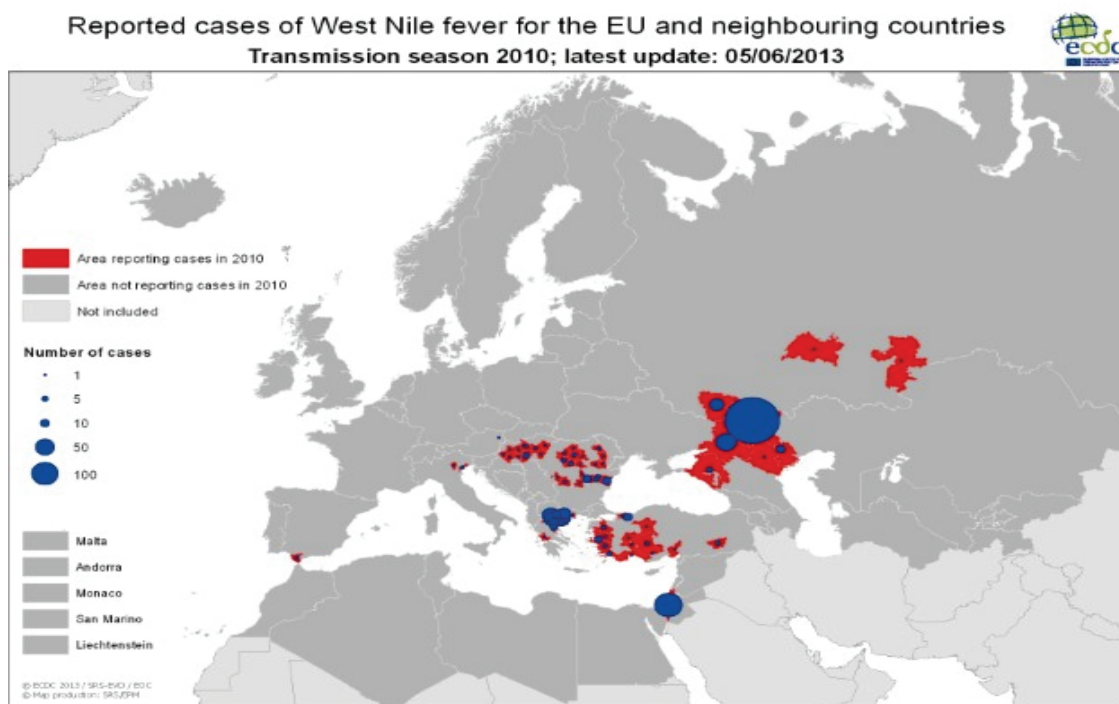
Izvor: ECDC

Slika 2. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i Mediteranskom basenu od 2010. do 2014. godine

U periodu od 2010. do 2014. godine širu teritoriju Evrope je zahvatio talas brzog širenja groznice Zapadnog Nila, a ujedno su zabeležene epidemije sa velikim brojem obolelih u pojedinim evropskim zemljama (Grčka, Rusija, Srbija). Do danas se zna da u Evropi cirkuliše verovatno 5, a potencijano i 6 različitih linija *WNV* (linija 1, 2, 3, 4 i 8). Međutim najveće epidemije upravo izaziva virus linije 2 koji je u Evropi dokazano prisutan od 2004. godine i odgovoran je za brzo širenje groznice Zapadnog Nila (*Slika 2*).

Virus Zapadnog Nila u Evropi i susjednim zemljama u 2010. godini

U 2010. godini groznica Zapadnog Nila je dijagnostifikovana u: Austriji, Grčkoj, Mađarskoj, Italiji, Rumuniji, Španiji, Turskoj i Rusiji (Slika 3).



Izvor: ECDC

Slika 3. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i susjednim zemljama tokom 2010. godine

Epidemija u Grčkoj je izbila u periodu jula i avgusta meseca 2010. godine kada je zabeležen 81 slučaj neuroinvazivne bolesti u regionu centralne Makedonije. Kao i u ostalim opisanim epidemijama izazvanim virusom groznice Zapadnog Nila najviše su bili pogođeni stariji ljudi (Papa et al., 2010). Do kraja sezone 2010. godine zabeleženo je ukupno 262 obolelih, od kojih je 197 (75%) imalo simptome neuroinvazivne bolesti (encefalitis, meningitis ili akutna flacidna paraliza). Epidemija je odnela 35 života (Danis et al, 2011). Paralelno sa izbijanjem epidemije iz komaraca *Culex pipiens* izolovan je *WNV* linije 2 koji je na osnovu analize 146-nt fragmenta nestrukturnog proteina NS5 pokazao homologiju sa izolatima iz Mađarske i Južnoafričke Republike, dok se razlikovao od izolata iz Rusije (Papa et al., 2011). Izolovani virus je imao aminokiselinsku supstituciju H249P čime se objašnjava povećana virulencija u odnosu

na virus izolovan u Mađarskoj, gde nisu zabeležene epidemije sa većim brojem obolelih (Papa et al., 2011 a).

U Rumuniji je tokom 2010. godine zabeleženo ukupno 57 slučajeva (potvrđeni i verovatni slučajevi) od kojih je 31 imalo simptome meningitisa, 19 meningoencefalitisa i 4 encefalitisa, 2 sa groznicom i makulopapularnim osipom i 1 sa prolongiranom groznicom. Zabeleženo je 5 smtnih ishoda. Molekularnom analizom sekvence izolovanog *WNV* pokazano je da je uzročnik epidemije virus linije 2 koji je pokazao najveći stepen sličnosti (99,3%) sa virusom koji cirkuliše u Rusiji (Volgograd, 2007) (Sirbu et al., 2011).

U Turskoj je epidemija *WNV* tokom 2010. godine obuhvatila ukupno 47 slučajeva bolesti kod ljudi. Prvi zabeleženi slučaj akutne infekcije sa *WNV* u Turskoj se desio u regiji Manisa. Smatra se da je virus i prethodno bio prisutan, ali da je najverovatnije dijagnostifikovan kao virusni meningoencefalitis nepoznate etiologije (Kalaycioglu et al., 2012).

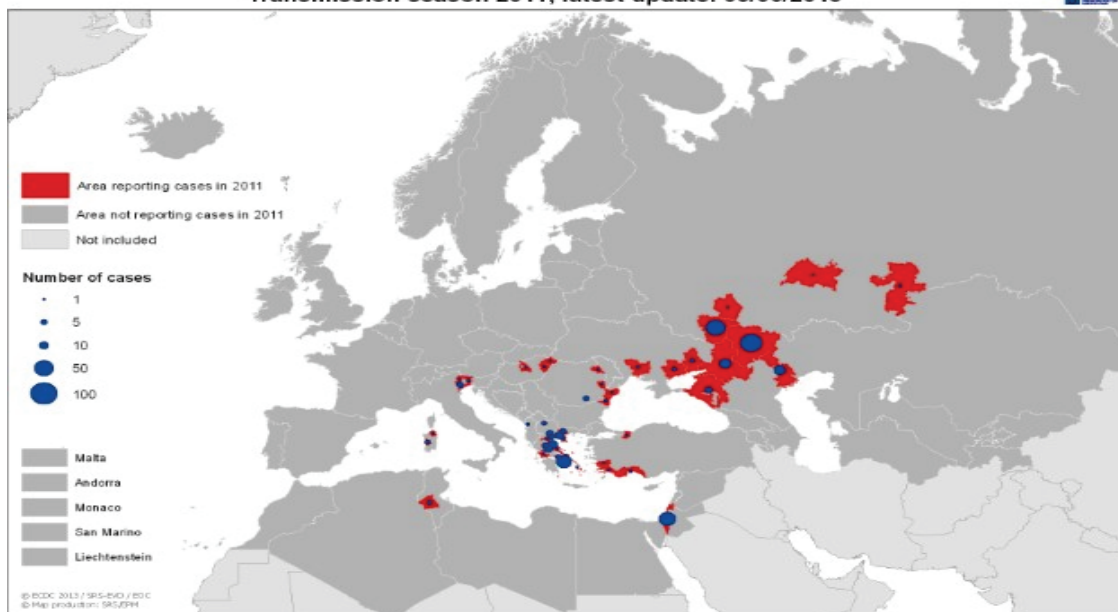
U Italiji je 2008. godine zabeležena ponovna pojava *WNV* kada su oboleli konji u regionima Emilia-Romagna i Veneto. Od tada je primećen i porast broja zabeleženih slučajeva bolesti kod ljudi. Tako je 2008. zabeleženo 8 slučajeva neuroinvazivne bolesti kod ljudi, 2009. godine čak 18, da bi se taj broj smanjio u 2010. godini na 3. Tokom ove tri godine svi zabeleženi slučajevi bolesti su bili u severnoj Italiji uzrokovani virusom linije 1 (Rizzo et al.2012).

Virus Zapadnog Nila u Evropi i susednim zemljama u 2011. godini

U 2011. godini zabeleženo je dalje širenje *WNV* i pojava potvrđenih slučajeva u novim zemljama Evrope (slika 4, tabela 1).

U Italiji je tokom 2011. godine dokumentovana prva pojava *WNV* linije 2. Prvo je virus izolovan iz pulova komaraca i materijala poreklom od goluba (Savini et al., 2012), a potom je zabeležen i prvi slučaj bolesti kod ljudi uzrokovan *WNV* linije 2 (Bagnarelli et al., 2011).

Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries
Transmission season 2011; latest update: 05/06/2013



Izvor: ECDC

Slika 4. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i susjednim zemljama tokom 2011. godine

Tabela 1. Broj prijavljenih slučajeva groznice Zapadnog Nila u Evropi za 2011. godinu
(do 24.11.2011. godine) izvor:ECDC

Zemlja	Ukupan broj slučajeva
Grčka	69
Italija	14
Rumunija	10
Albanija	2
Makedonija	4
Izrael	33
Rusija	136
Tunis	3
Turska	3
Ukrajina	8
UKUPNO	282

Virus Zapadnog Nila u Evropi i susednim zemljama u 2012. godini

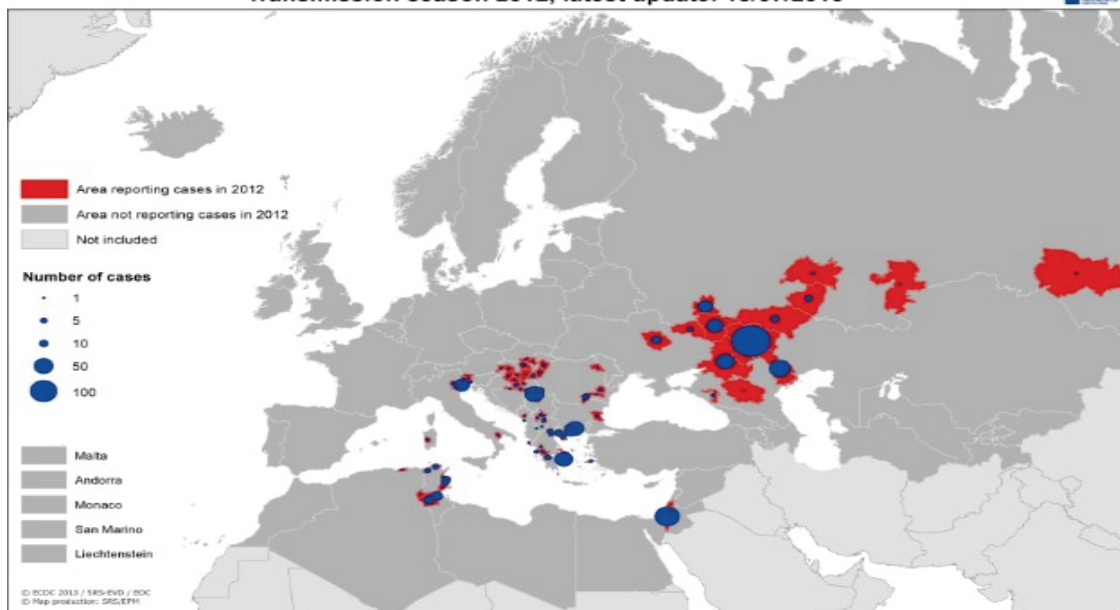
Tokom 2012. godine broj obolelih ljudi i dalje je u porastu, kao i broj država koje prijavljuju pojavu bolesti po prvi put (slika 5, tabela 2).

Tabela 2. Broj prijavljenih slučajeva groznice Zapadnog Nila u Evropi za 2012. godinu
(do 18.07.2013. godine) izvor:ECDC

Zemlja	Verovatni slučajevi	Potvrđeni slučajevi	Ukupno
Bugarska	0	2	2
Grčka	113	48	161
Mađarska	8	9	17
Italija	11	39	50
Rumunija	1	13	14
Alžir	1	0	1
Hrvatska	3	2	5
Makedonija	5	1	6
Izrael	62	31	83
AP Kosovo	4	0	4
Crna Gora	1	0	1
Okupirana	1	1	2
Rusija			447
Srbija	28	41	69
Tunis	30	33	63
Ukrajina			12
UKUPNO			937

Tokom 2012. godine je utvrđena i prva epidemija *WNV* u Republici Srbiji (Popović et al., 2013).

Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries
Transmission season 2012; latest update: 18/07/2013

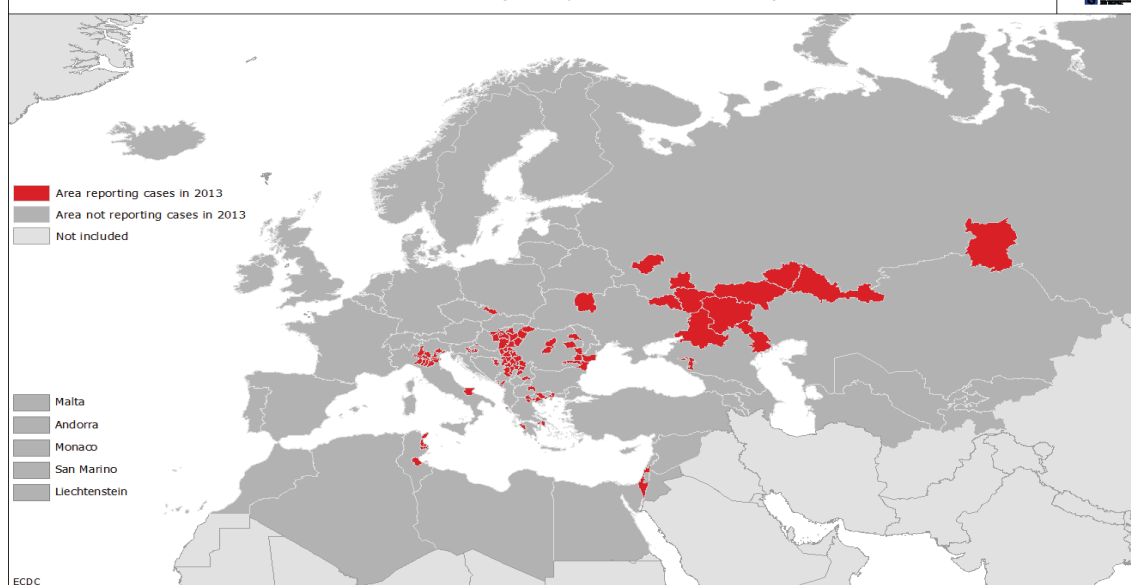


Izvor: ECDC

Slika 5. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i susjednim zemljama 2012 /2013. godine

Virus Zapadnog Nila u Evropi i susjednim zemljama u 2013. godini

Distribution of West Nile fever cases by affected areas, European region and Mediterranean basin
Transmission season 2013 (latest update 20 November 2014)



Izvor:ECDC

Slika 6. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i Mediteranskom basenu 2013. godine

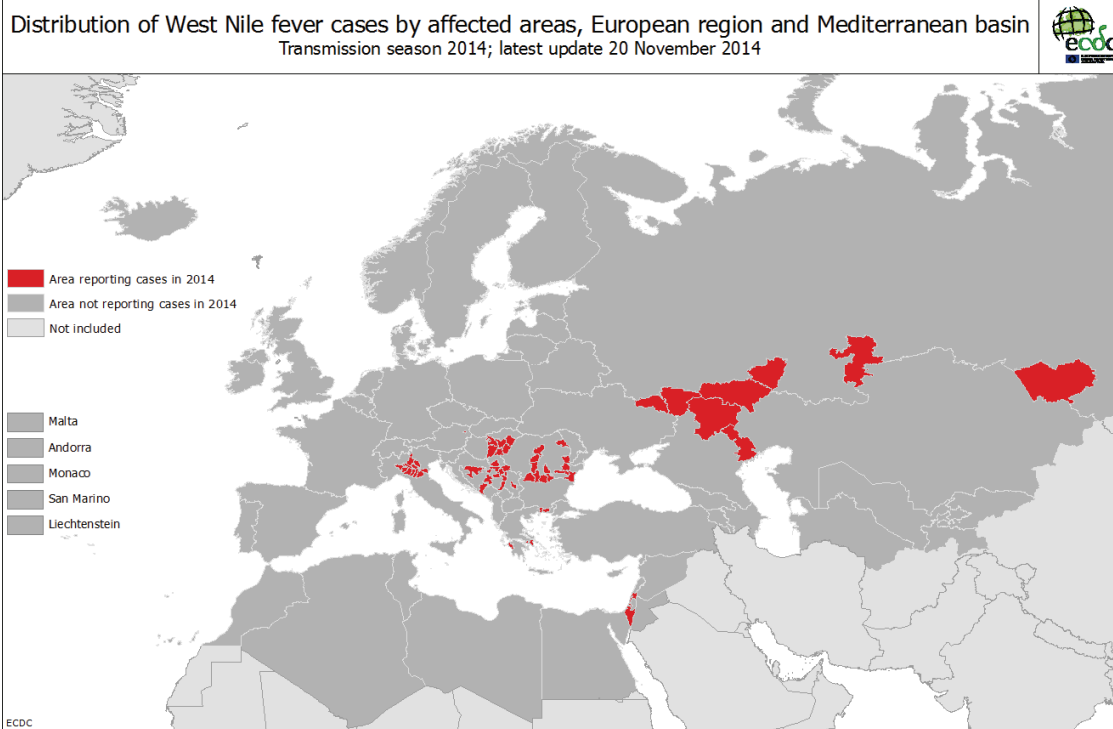
Tokom 2013. godine zabeleženo je ukupno 785 prijavljenih slučajeva *WNV* u 15 zemalja (slika 6). U Republici Srbiji je zabeleženo 302 slučaja, što je bio najveći broj prijavljenih slučajeva u Evropi (tabela 3).

Tabela 3. Broj prijavljenih slučajeva groznice Zapadnog Nila u Evropi za 2013. godinu (do 06.06.2014. godine) izvor:ECDC

Zemlja	Ukupan broj slučajeva
Hrvatska	16
Češka	1
Grčka	86
Mađarska	31
Italija	69
Rumunija	24
Slovenija	1
Bosna i Hercegovina	3
Makedonija	1
Izrael	63
Crna Gora	4
Ruska federacija	177
Srbija	302
Tunis	6
Ukrajina	1
UKUPNO	785

Virus Zapadnog Nila u Evropi i susednim zemljama u 2014. godini

Tokom 2014. godine dolazi do postepenog smirivanja situacije u Evropi, sa ukupno zabeleženih 210 slučajeva groznice Zapadnog Nila. Broj obolelih ljudi u Srbiji je i dalje najviši u Evropi- 76 slučajeva (tabela 4), ali je primetna tendencija postepenog smirivanja aktivnosti virusa, najverovatnije usled stvaranja imuniteta kod stanovništva (slika 7).



Izvor: ECDC

Slika 7. Epidemiološka slika groznice Zapadnog Nila u Evropi i Mediteranskom basenu 2014. godine

Tabela 4. Broj prijavljenih slučajeva groznice Zapadnog Nila u Evropi za 2014. godinu izvor:ECDC

Zemlja	Ukupan broj slučajeva
Austrija	1
Grčka	15
Mađarska	11
Italija	24
Rumunija	23
Bosna i Hercegovina	13
Izrael	17
Palestina	1
Ruska federacija	29
Srbija	76
UKUPNO	210

Tokom 2014. godine primetno je opadanje broja obolelih ljudi, što se može tumačiti kako uticajem klimatskih faktora na populaciju vektora tako i povećanom prokuženošću populacije specifičnim antitelima za *WNV*. Broj obolelih evidentiran u Republici Srbiji i dalje je visok u odnosu na proseke u drugim evropskim zemljama.

2.7.4. Epizootiološki i epidemiološki podaci o virusu Zapadnog Nila u Republici Srbiji posle 2000. godine

Hrnjaković Cvjetković i sar. 2007. godine objavljuju seroprevalenciju na *WNV* od 7.5% u populaciji ljudi imunoenzimskim testom koji su tokom prethodnog petogodišnjeg perioda bili hospitalizovani sa dijagnozom virusnog encefalitisa ili meningoencefalitisa nepoznate etiologije u Vojvodini (Hrnjaković Cvjetković et al., 2007).

Tasić i sar. 2008. godine ispituju seroprevalenciju ljudi profesionalno izloženih ujedima komaraca i otkrivaju prisustvo specifičnih antitela u 4.76% od 105 ispitanih uzoraka metodom indirektno imunofluorescencije (Tasić et al., 2008).

Đuričić i sar. 2011. godine objavljuju preliminarne rezultate ispitivanja prisustva specifičnih antitela kod različitih životinjskih vrsta sa različitih lokaliteta u Republici Srbiji. Ispitano je ukupno 1196 krvnih seruma, od toga 789 konja, 66 magaraca, 128 pasa, 213 seruma domaće živine, 66 seruma ljudi. Ustanovljena je seroprevalencija od 2.79% u populaciji konja, 1.56% u populaciji pasa, 0.94% u populaciji domaće živine (Đuričić et al., 2011).

Lupulović i sar. su 2011. godine ispitivali seroprevalenciju *WNV* ELISA testom i neutralizacionim testom redukcije plakova (PRNT-90) u populaciji konja na teritoriji Vojvodine kada su ustanovili seroprevalenciju od 12% na uzorku od 349 konja (Lupulović et al., 2011).

Samokovlija i sar. 2012. godine ukazuju da su prema njihovim istraživanjima uzoraka krvnih seruma ljudi, pasa, konja, goveda, ovaca, gusaka, pataka, kokošaka i fazana specifična antitela za *WNV* ustanovljena kod konja (19 pozitivnih od 235 ispitanih-8.08%), pasa (13/468-2.78%) i ljudi (1/456) tokom 2011. godine. Rađena je

metoda agar gel imunodifuzije uz potvrdu dobijenih pozitivnih rezultata testom redukcije plakova (PRNT-90) (Samokovlija et al., 2012).

Đuričić i sar. su ispitivali seroprevalenciju *WNV* u populacijama 8 različitih vrsta životinja (1133 konja, 66 magaraca, 1076 pasa, 318 domaće živine, 102 ovce, 6 koza, 30 goveda i 5 jelena) i ljudi (sa ukupno 882 uzorka krvnih seruma) na 18 izabranih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije u periodu od 2008. do 2012. godine metodom agar gel imunodifuzije uz potvrdu pozitivnih rezultata neutralizacionim testom redukcije plakova (PRNT-90). Ustanovljeno je da je seroprevalencija iznosila 3,97% kod konja, 0.93% kod pasa, 0.31% kod domaće živine i 1,36% kod ljudi. Pozitivnih rezultata je bilo na 9 od ukupno 18 ispitivanih lokacija. Najveća seroprevalencija je ustanovljena u populaciji konja koji su se nalazili na lokalitetima Uba, Pančeva, Požarevca, Beograda i Šapca. U ispitivanoj populaciji pasa najveća seroprevalencija je zabeležena u Novom Pazaru (6.45%), Kragujevcu i Beogradu. U populaciji ljudi seropozitivnost je zabeležena u uzorcima iz Peći (5.91%) i Požarevca (0.37%) (Đuričić et al., 2013).

Medić i sar. su na uzorku od 252 krvna seruma konja prikupljenih u periodu od 2007. do 2011. godine na teritoriji severne Srbije metodama komercijalne i “in house” ELISA ustanovili seroprevalenciju od 28,6% (Medić et al., 2014).

Petrić i sar. su tokom 2010. godine izolovali WN virusnu RNK iz tri od 50 pulova komaraca *Cx. pipiens pipiens*, što je predstavljalo prvi dokaz prisustva *WNV* kod komaraca u Republici Srbiji (Petrić et al., 2012).

Popović i sar. 2013. godine objavljuju prve rezultate ispitivanja 58 pacijenata obolelih od groznice Zapadnog Nila tokom epidemije koja je prvi put zabeležena u Republici Srbiji 2012. godine. Od 58 pacijenata 44 su živeli u regionu grada Beograda sa prigradskim mestima, 52 pacijenta su razvila neuroinvazivni oblik bolesti od kojih je 8 imalo simptome meningitisa, 44 encefalitis, 13 akutnu flacidnu paralizu. Devet pacijenata je umrlo, 35 se oporavilo do otpuštanja iz bolnice. Interesantno je da je srednja vrednost starosti hospitalizovanih pacijenta bila 61 godinu (Popović et al., 2013).

Petrović i sar. 2013. godine objavljuju rezultate monitoringa *WNV* kod divljih ptica na teritoriji Vojvodine. Ispitano je 133 uzorka od 45 različitih vrsta divljih ptica koji su prikupljeni u periodu od januara do septembra 2012. godine. Uzorci krvnih seruma I

tkiva divljih ptica testirani su imunoenzimskim testom (ELISA), testom redukcije plakova (PRNT) i metodom reverzne transkripcije polimeraza lančane reakcije u realnom vremenu (RT-qPCR). Specifična antitela su otkrivena u 8% krvnih seruma ispitivanih ptica. Pozitivne su bile sledeće vrste ptica: labud (*Cygnus olor*), belorepi orao (*Haliaeetus albicillas*) i fazan (*Phasianus colchicus*). U devet uzoraka tkiva ptica detektovano je prisustvo virusne RNK (u uzorcima tri jastreba, jedne brkate senice, jednog fazana, jednog galeba, jedne sive vrane i dva belorepa orla), a analiza genomskih sekvenci izolata je pokazala da se radi o virusu linije 2 koji je u bliskoj filogenskoj vezi sa izolatima iz Grčke, Mađarske i Italije (Petrović et al., 2013).

Petrović i sar. u preglednom radu o epidemiologiji *WNV* u Republici Srbiji navode podatke da je tokom 2012. godine ustanovljena seropozitivnost u populaciji konja Vojvodine od 49.23%, kao i da je virusna RNK detektovana u 9.55% pulova komaraca (*Cx.pipiens pipiens*, *Aedimorphus vexans*, *Culiseta annulata*) iz 9 opština (Petrović et al., 2013a).

Escribano-Romero i sar. prikazuju rezultate pregleda 688 uzoraka dobijenih od 279 domaćih svinja, 318 divljih svinja i 91 srndaća metodom imunoenzimskog ELISA testa i virus neutralizacionog testa kada je zabeležena seropozitivnost kod 15.4% domaćih svinja, 17.6% divljih svinja i 18.7% srndaća. Četiri uzorka seruma divljih svinja su pokazala specifičnu reakciju za USUTU virus, što govori u prilog da oba flavivirusa kruže u Republici Srbiji (Escribano-Romero et al., 2015).

2.8 SEROLOŠKE METODE U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI INFEKCIJE VIRUSOM ZAPADNOG NILA

Prema Chapter 2.1.20. OIE Terrestrial Manuel, 2013 koji se odnosi na *WNV* serološke metode koje su preporučene za dijagnostiku prisustva antitela za *WNV* su imunoenzimski ELISA test (IgM i IgG), test inhibicije hemaglutinacije (HI), neutralizacioni test redukcije plakova ili virus neutralizacioni test.

1. Imunoenzimski metod (ELISA test) - IgM ELISA test koji se preporučuje za utvrđivanje prisustva antitela kod konja u ranoj infekciji i to u formi kompetitivnog ELISA testa, dok se napominje da su u upotrebi brojni indirektni ELISA testovi. Obe ELISA tehnike imaju slabiju specifičnost, pošto su moguće unakrsne reakcije sa drugim virusima iz grupe Japanskog encefalitisa. Korisne su u nadzoru i epidemiološkim studijama, ali pozitivne rezultate treba potvrditi nekim testom veće specifičnosti. Većina ELISA testova će identifikovati antitela svih klasa imunoglobulina (IgM, IgG i dr.).
2. Test neutralizacije - može se koristiti za utvrđivanje prisustva specifičnih *WNV* antitela u serumima svih vrsta životinja. Neutralizacioni test redukcije plakova se radi na kulturi Vero ćelija. Ova metoda je tehnički zahtevna i obavlja se samo u pojedinim laboratorijama koje imaju uslove za izvođenje ovog testa (nivoa biosigurnosti 3 ili 4). Standardni virus neutralizacioni test služi za identifikaciju i kvantifikaciju antitela za *WNV*, a dobijeni rezultati su slični onima iz zahtevnijeg neutralizacionog testa redukcije plakova (www.oie.int).

U upotrebi je i čitav niz drugih testova za serološku dijagnostiku, kako komercijalnih tako i „*in house*“ testova. Pojedine metode koje se mogu upotrebljavati su:

1. Agar gel imunodifuziona metoda po Ouchterlony-u (AGID) je u upotrebi dugi niz godina u određivanju prisustva precipitinskih antitela ili antigena (Ouchterlony, 1949, Ouchterlony, 1962).
2. Metoda indirektna imunofluorescencije (sekundarne imunofluorescencije) koristi osobinu dva različita antitela za međusobnim vezivanjem. Jedno (iz ispitivanog uzorka) se specifično vezuje za epitope antigena, a drugo je obeleženo fluorescentnom bojom i vezuje se za antitela iz ispitivanog uzorka. Fluorescencija se posmatra pomoću mikroskopa sa fluorescencijom.

3. Metoda inhibicije hemaglutinacije (HI) se koristi u detekciji antitela za *WNV* i druge Arboviruse od pedesetih godina dvadestog veka (Casals and Brown,1954). U osnovi testa je mogućnost virusa da aglutiniraju eritrocite pojedinih vrsta životinja i ljudi, te da se formiraju specifične aglutinirajuće strukture na dnu obično mikrotitar ploče. U slučaju inhibicije hemaglutinacije antitela prisutna u ispitujućem serumu će se vezati za virusne epitope i blokirati reakciju aglutinacije sa eritrocitima koji će se istaložiti na dnu mikrotitar ploče.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su da se pripreme „*in house*“ testovi (AGID, IFA i ELISA) za serološku dijagnostiku *WNV* i da se uporede dobijeni rezultati „*in house*“ testova sa rezultatima dobijenih primenom komercijalno dostupnih testova u cilju određivanja osetljivosti i specifičnosti upotrebljenih testova radi utvrđivanja koji od primenjenih testova su najpogodniji za otkrivanje infekcije *WNV*. Primenom pomenutih testova potrebno je da se utvrdi seroprevalencija u populacijama ispitivanih vrsta (konji, ljudi, psi) na odabranim lokalitetima, što omogućava mapiranje ugroženih područja i definisanje mera kontrole i suzbijanja infekcije.

3.2. ZADACI ISTRAŽIVANJA

Radi ostvarivanja zadatih ciljeva istraživanja definisani su sledeći zadaci:

1. Priprema „*in house*“ testova (AGID, IFA, ELISA) za serološku dijagnostiku *WNV* koji će biti specifični i osetljivi, a istovremeno ekonomski prihvatljivi.
2. Poređenje rezultata dobijenih primenom „*in house*“ seroloških testova (ELISA, IFA) i komercijalno dostupnih testova u cilju određivanja osetljivosti i specifičnosti upotrebljenih testova, što je od velikog značaja za pouzdanu dijagnostiku ove virusne infekcije.
3. Utvrđivanje seroprevalencije u populacijama ispitivanih vrsta (konja, pasa i ljudi) na odabranim lokalitetima na teritoriji Republike Srbije.
4. Preliminarno obeležavanje i mapiranje ugroženih područja na teritoriji Republike Srbije.
5. Definisanje mera kontrole i suzbijanja infekcije *WNV* kod prijemčivih vrsta.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Materijal potreban za sakupljanje i obradu uzoraka krvnih seruma konja, pasa i ljudi sa odabranih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije

U cilju adekvatnog uzorkovanja krvnih seruma konja, pasa i ljudi upotrebljeni su sterilni špricevi, igle, vakutajner sistem, sterilne epruvete, a radi dezinfekcije mesta uboda korišćen je 70% rastvor etil-alkohola. Po izdvajanju seruma od pune krvi uzorci su centrifugirani na centrifugi *Sorvall Superseed RC2-B*, a potom skladišteni u ependorf epruvete (1,5 ml) sa zapušaćem i ostavljeni u zamrzivaču na -18 °C do ispitivanja.

4.1.1.1. Uzorkovanje krvnih seruma konja

U cilju ispitivanja seroprevalencije antitela za *WNV* izvršeno je uzorkovanje ukupno 303 krvnih seruma odraslih konja sa 10 odabranih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije. Svi uzorci su uzorkovani u periodu od kraja 2011. do početka 2014. godine. Spisak lokaliteta, kao i broj uzoraka po lokaliteta prikazan je u *Tabeli 5*.

Krv je uzorkovana od odraslih životinja dobrog opšteg zdravstvenog stanja. Na lokalitetima Pančevo, Šabac, Beograd (deo uzoraka- 16 komada), Leskovac i Požarevac konji su trajno smešteni u krugu hipodroma na navedenim lokacijama. Na lokalitetima Bačke Topole (Zobnatice) i Stare Planine (Gornji Krivodol) konji su se nalazili u ergelama uglavnom u slobodnom načinu držanja. U Sremskoj Mitrovici konji pripadaju Kazнено- popravnom zavodu Sremska Mitrovica i stacionirani su u stajama u okviru kompleksa. Na lokalitetima Subotice, šire teritorije grada Beograda, Novog Sada, Banatskog Karlovca uzorkovani serumi pripadaju konjima individualnih vlasnika životinja.

Tabela 5. Pregled lokaliteta i broja uzoraka krvnih seruma konja

Lokaliteti (šira teritorija)	Broj uzoraka
Subotica	1
Bačka Topola (Zobnatica)	12
Novi Sad	7
Sremska Mitrovica	15
Šabac	30
Banatski Karlovac	17
Beograd	172
Pančevo	5
Požarevac	15
Leskovac	12
Stara Planina (Gornji Krivodol)	17
Ukupno: 10	303

4.1.1.2. Uzorkovanje krvnih seruma pasa

Tabela 6. Pregled lokaliteta i broja uzoraka krvnih seruma pasa

Lokaliteti (šira teritorija)	Broj uzoraka
Sremska Mitrovica	20
Loznica	20
Šabac	20
Vršac	20
Pančevo	20
Beograd	24
Ub	12
Požarevac	8
Leskovac	20
Bujanovac	20
Ukupno: 10	184

U cilju utvrđivanja seroprevalencije u populaciji pasa izabrano je uzorkovanje krvnih seruma pasa nepoznatih vlasnika (uličnih pasa). Ulični psi zauzimaju specifičnu ekološku nišu, a njihov način života čini ih izloženima komarcima prenosiocima *WNV*. Ukupno je uzorkovano 184 krvnih seruma pasa smeštenih u prihvatilišta za pse (azile) na teritoriji odabranih lokaliteta u periodu od 2011. do 2014. godine. Pregled lokaliteta i broja uzoraka po lokalitetu dat je u *Tabeli 6*.

4.1.1.3. Uzorkovanje krvnih seruma ljudi

Uzorkovanje krvnih seruma ljudi izvršeno je u saradnji sa Klinikom za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije. U periodu 2012. i 2013. godine ukupno je uzorkovano 153 krvnih seruma ljudi koji su bili hospitalizovani na Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije sa sumnjom na groznicu Zapadnog Nila. Uzimani su uzorci likvora od pacijenanta u akutnoj fazi infekcije, kao i krvni serumi u periodu od 10 do 14 dana po pojavi kliničkih simptoma bolesti.

4.1.2. Virus Zapadnog Nila

Radi pripreme „*in house*“ testova korišćen je *WNV - Ital/Milano (UniVetMed, Vienna, Austria)*. To je virus linije 1 - izolat iz severne Italije.

4.1.3. Materijal potreban umnožavanje virusa Zapadnog Nila

U cilju pripreme „*in house*“ testova bilo je potrebno umnožiti *WNV*. U tom cilju korišćene su kulture ćelija (*RK-13, Vero, Vero E6*), potrebna podloga za održavanje kulture ćelija *Eagle MEM* podloga (*Institut za imunologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd*) sa 10% ili 5% fetalnog bovinog seruma (*PAA Laboratories, GE Healthcare, USA*), tripsin *EDTA (PAA Laboratories, GE Healthcare, USA)*, PBS rastvor za ispiranje kulture ćelija (*Institut za imunologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd*), flaskovi za kultivaciju (*Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*), sterilni špricevi, igle, pipete i drugi potrošni materijal. Za inkubaciju upotrebljen je termostat na temperaturi od 37 °C.

4.1.4. Materijal za dobijanje specifičnog imunog seruma na laboratorijskim životinjama

U cilju dobijanja specifičnog poliklonskog imunog seruma za *WNV*, kao i negativnog kontrolnog seruma, korišćeno je ukupno 126 miševa starih 6 nedelja, muškog pola (soj *Swiss albino- Institut za imunologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd*). U radu sa laboratorijskim životinjama korišćen je rastvor etra za analgeziju pri iskrvarenju, kao i potrebni sterilni hirurški instrumenti, epruvete, špricevi, Pasterove kapilare.

Radi dobijanja negativnog kontrolnog seruma neinficirani zdravi miševi su iskrvareni presecanjem brahijalnog plexusa posle primene adekvatne analgezije.

Radi dobijanja pozitivnog specifičnog poliklonskog seruma za *WNV* pripremljen je inokulum virusnog antigena na sledeći način: Virus Zapadnog Nila je umnožen na kulturama ćelija RK 13, Vero i Vero E6 u flaskovima od 25 cm². Nakon što je citopatogeni efekat virusa obuhvatio 80% i više ćelija, vršeno je trokratno zamrzavanje i odmrzavanje flaskova da bi se što više oslobodio virus iz inficiranih ćelija. Medijum za kulturu ćelija, odnosno supernatant iz flaskova u kojem su se nalazile oslobođene virusne partikule i ostaci inficiranih ćelija je potom centrifugiran u centrifugi na 1000 rpm u trajanju od 10 minuta radi oslobađanja od krupnih ćelijskih partikula. Supernatant je zatim odliven od istaloženog ostatka ćelija i u njega je dodat 35% formaldehid tako da u bude u koncentraciji 1:1000 u konačnoj zapremini supernatanta. Posle homogenizacije rastvor supernatanta je ostavljen 24 časa u frižideru na +4 °C radi inaktivacije virusa, što je potvrđeno ogledom na kulturi ćelija. Supernatant je zatim korišćen za imunizaciju miševa. Miševi su imunizovani trokratno u razmacima od 7 dana intraperitonealnom inokulacijom 0.1 ml pripremljenog supernatanta kao inaktivisane vakcine da bi se miševi zaštitili od uginuća usled infekcije živim virusom. Posle 14 dana od poslednje imunizacije miševi su žrtvovani, izdvojen je krvni serum i skladišten u zamrzivaču na -18 °C do daljeg rada.

4.2. METODE RADA

4.2.1. Metoda određivanja koncentracije proteina po Lowry-u (*Folin-Ciocalteu method*)

Metoda određivanja koncentracije proteina po Lowry-u (*Folin-Ciocalteu method*) je kolorimetrijska metoda određivanja koncentracije proteina u rastvoru koja se bazira na određivanju sadržaja aminokiselina tirozina i triptofana i upotređivanja dobijene boje rastvora sa vrednostima dobijenim iz standardne krive standardnog proteina, najčešće govedeg serumskog albumina (*BSA*). Najčešće je potrebno napraviti više serijskih razređenja ispitivanog rastvora, pošto se linearna zavisnost koncentracije proteina i intenziteta boje posle dodavanja *Folin-Ciocalteu* reagensa očitava na ograničenom rasponu koncentracija proteina. Korišćena je procedura opisana u radu *Lowry et al.*, 1951. Za očitavanje optičke gustine koristi se filter od 600 nm, a u radu je korišćen aparat za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina *Lowry* metodom *Cecil Ce 2021 (Buck Scientific, Inc., Norwalk CT, USA)*.

4.2.2. Agar gel imunodifuziona metoda (AGID)

Korišćena procedura je opisana u Ouchterlony, 1949 i Ouchterlony, 1962.

Test se bazira na mogućnosti precipitinskih antitela i antigena da difunduju kroz agar gel i da se na dodirnoj površini stvara precipitinska linija bele boje koja označava pozitivnu reakciju.

Procedura kojom smo izvodili test je sledeća: na ploči sa agar gelom se probuše bazenčići prema šablonu tako da oko centralnog bazenčića postoji šest bazenčića raspoređenih u krugu oko centralnog bazenčića na jednakom rastojanju. U ovom slučaju, poznat antigen se postavlja u centralni bazenčić, dok se oko njega raspoređuju ispitivani i kontrolni serumi. U toku inkubacije od ukupno 48 sati na temperaturi od 37 °C rastvori difunduju kroz gel i na dodirnoj liniji se stvara kompleks antigen-antitela u slučaju da su prisutna u ispitivanom serumu. Takva reakcija je vidljiva u obliku bele precipitinske linije. Očitavanje rezultata se vrši na osnovu prisustva specifičnih

precipitinskih antitela sa ispitivanim antigenom, a u poređenju sa reakcijom pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma.

Da bi se dobio antigen koji se koristi u ovoj reakciji primenjen je princip koncentracije virusa upotrebom polietilen glikola koji je opisan u radu Cumakov et al., 1969.

Materijal potreban za pripremu antigena i izvođenje agar gel imunodifuzione metode (AGID): Petri ploče, *Noble* agar (*Merck Serono, Germany*), fiziološki rastvor-0.9% NaCl, pipete, šablon za bušenje bazenčića, epruvete za centrifugiranje od 50 ml, polietilenglikol (PEG Mr 6000, *Merck Serono, Germany*), borat fiziološki rastvor.

Oprema potrebna za pripremu antigena i izvođenje reakcije: centrifuga sa hlađenjem (*Sorvall Superseed RC2-B*), pipete, nastavci za pipete, vakuum pumpa, lupa, lampa, vlažna komora, termostat i dr.

Priprema antigena: Posle procedure zamrzavanja i odmrzavanja (tri puta) inficiranih kultura Vero E6 ćelija sa umnoženim *WNV*, ukupna količina tečnosti iz flaskova se izmeri i centrifugira 30 minuta na oko 17.000 x g (7000 rpm) na temperaturi od +4 °C (*Sorvall RC2-B superseed*). Supernatantu se doda polietilenglikol (PEG Mr 6000) u koncentraciji od 8%. Posle ekstrakcije od jednog sata na +4 °C, sadržaj se centrifugira 30 minuta na oko 3.200 x g (3000 rpm). Sediment se resuspenduje u borat fiziološkom rastvoru pH 9.0 tako da finalna koncentracija bude 50 puta koncentrovan. Dobijeni antigen se skladišti na +4 °C do upotrebe.

Priprema gela: 1% rastvor *Noble* agara u fiziološkom rastvoru se zagreje do potpunog otapanja agara. Razliva se u Petri ploče neposredno pre rada, hladi se, a zatim se gel iseca po standardnoj proceduri za AGID test.

Izvođenje reakcije: Prethodno inaktivisani ispitivani serumi u vodenom kupatilu na 56 °C u trajanju od 30 minuta se naliju u spoljne bazenčiće, a u centralni stavi pripremljeni antigen. Kontrolni serumi miša (pozitivan i negativan-dobijeni imunizacijom miševa) se postavljaju po 2 bazenčića unakrsno. Reakcija se očitava posle inkubiranja u vlažnoj komori 24 do 48 časova na sobnoj temperaturi i rezultat se donosi na osnovu pojave ili odsustva bele precipitinske linije na dodirnoj zoni difuzije uz jasnu precipitaciju kontrolnog pozitivnog seruma i odsustva precipitacije sa negativnim kontrolnim serumom.

4.2.3. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)

Metoda indirektne imunofluorescencije se bazira na vezivanju specifičnih antitela za antigen koji se nalazi u inficiranim Vero ćelijama, a potom vezivanju fluoresceinskom bojom obeleženih antitela protiv antitela ispitivane vrste životinja za već nastale komplekse čime se reakcija uočava pod fluorescentnim mikroskopom.

4.2.3.1. Priprema „in house“ testa indirektne imunofluorescencije (IFA)

Materijal potreban za pripremu „in house“ testa indirektne imunofluorescencije (IFA) obuhvata: ploče sa U dnom, teflonom obložene ploče od 5 mm sa bazenčićima (*INEP, Beograd*), PBS rastvor, flurescein obeležena anti vrsta antitela (Fluorescein isothiocyanate- FITC) (*INEP, Beograd*), Evans plava boja (*Evans blue*), aceton (*Merck Serono, Germany*), glicerol, epruvete za centrifugiranje.

Od opreme su potrebni: pipete, nastavci za pipete, termostat, magnetne mešalice i magneti, posuda za ispiranje, vakuum pumpa, pokrovna stakla, mikroskop sa fluorescencijom.

Priprema antigena: Za rad se koristi umnožen WN virus na kulturi ćelija sa 30-40% citopatogenog efekta. Inficirane ćelije u kojima je virus se prikupe u epruvetu i centrifugira 3 puta po 10 minuta na 221,81 x g (800 rpm) praćeno ispiranjem sa sterilnim PBS rastvorom (svaki put se supernatant odbaci i zadrži sediment). Posle zadnjeg ispiranja sediment se resuspenduje u 2-3 kapi PBS i doda se 10% v/v neinficiranih Vero ćelija, pa se nanose Pasterovom pipetom na teflonske ploče sa bazenčićima (za IFA). Posle sušenja na sobnoj temperaturi (2 sata) pločice sa antigenom se fiksiraju prethodno ohlađenim acetonom u trajanju od 7 minuta. Pripremljen antigen za IFA se čuva na -18 °C u tamnoj komori do upotrebe (*Slika 8*).

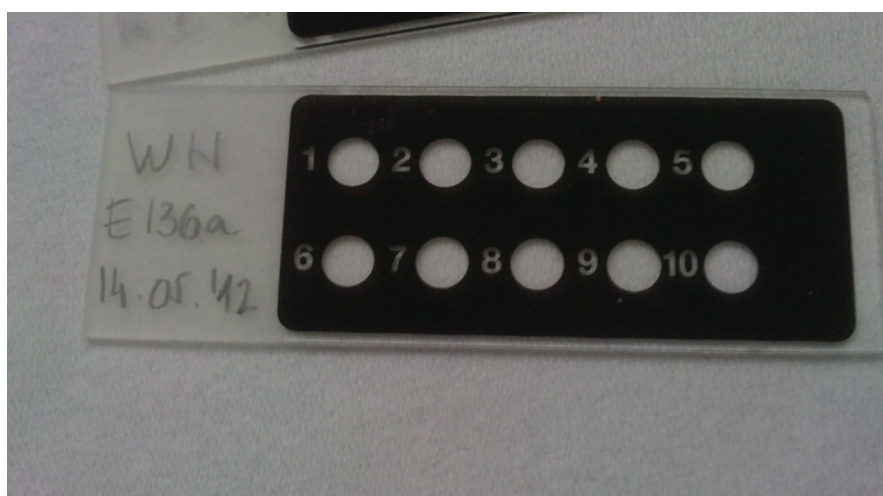
Priprema FITC obeleženih anti species antitela: prema uputstvu proizvođača (*INEP, Beograd*) sa dodatkom Evans plave boje.

Priprema ispitivanih uzoraka: Pri skriningu rađeno je razblaženje ispitivanih uzoraka krvnih seruma konja, ljudi i pasa u PBS u razmeri 1:16 i 1:64. Pri titraciji ispitivanih seruma primenjeno je razblaženje u PBS u razmeri 1:16, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048.

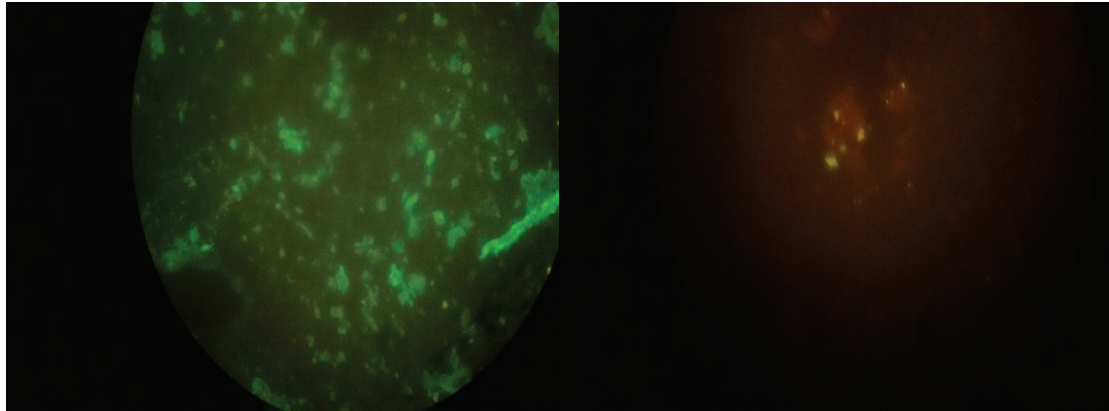
Izvođenje IFA reakcije: Pločice sa antigenom izvaditi sa -18°C i ostaviti na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Potopiti kratko u PBS pa osušiti na vakuum pumpi. Ispitivane serume kao i kontrolne serume naneti na pripremljena polja sa antigenom (skrining 1:16 i 1:64, titracije prema napravljenoj šemi). Inkubirati 30 minuta u termostatu na $+37^{\circ}\text{C}$. Isprati 3 puta u PBS uz mešanje na magnetnoj mešalici. Osušiti na vakum pumpi. Dodati antivista FITC obeležena antitela sa dodatkom Evans plave boje radi postizanja boljeg kontrasta pod fluorescentnim mikroskopom. Inkubirati 30 minuta u termostatu na $+37^{\circ}\text{C}$. Isprati 3 puta u PBS uz mešanje na magnetnoj mešalici. Osušiti na vakuum pumpi, nakapati glicerini i staviti pokrovna stakla. Posmatrati pomoću fluorescentnog mikroskopa sa filterom od 450 nm (Slika 9).

Procena stepena fluorescencije se radi na sledeći način:

1. Uočavanje sigurno negativnih ćelija (10% neinficiranih Vero ćelija dodatih pri pripremi antigena) - interna kontrola testa
2. Fluorescencija 25% ćelija vidljivih u vidnom polju obeležava se sa +/- kao sumnjiva reakcija
3. Fluorescencija od 25-50% ćelija u vidnom polju smatra se pozitivnom fluorescencijom na prisustvo specifičnih antitela za *WNV* u ispitivanom serumu
4. Fluorescencija 50-75% ćelija u vidnom polju smatra se jako pozitivnom fluorescencijom na prisustvo specifičnih antitela za *WNV* u ispitivanom serumu
5. Fluorescencija preko 75% ćelija u vidnom polju smatra se izuzetno pozitivnom fluorescencijom na prisustvo specifičnih antitela za *WNV* u ispitivanom serumu.



Slika 8. Pripremljen antigen za reakciju „in house“ indirektno imunofluorescencije



Slika 9. Prikaz reakcije „*in house*“ indirektne imunofluorescencije specifičnog pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma

4.2.3.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije

U radu je korišćen komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije proizvođača *Euroimmun, Germany*. Test je originalno dizajniran za primenu na serumima ljudi te sadrži specifične kontrolne serume (pozitivne i negativne). U komunikaciji sa tehničkom službom proizvođača dobijena je potvrda da se test pločice mogu koristiti za ispitivanja na drugim životinjskim vrstama uz primenu odgovarajućih fluorescein obeleženih antitela protiv ispitivane vrste životinja. U svrhu ispitivanja seroprevalencije za *WNV* kod konja korišćena su fluorescein obeležena anti konjska antitela klase IgG proizvođača *Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA* (goat-anti horse IgG- FITC) u preporučenom razređenju 1:100 prema uputstvu proizvođača. U ispitivanjima seruma pasa korišćena su fluorescein obeležena anti pseća antitela klase IgG (FITC-labelled anti-dog IgG (goat)) proizvođača *Euroimmun, Germany* prema uputstvu proizvođača i antitela proizvođača *INEP, Srbija* takođe prema uputstvu proizvođača u razređenju 1:20. Kao kontrolni serumi za utvrđivanje tačnosti reakcija konjskih seruma i seruma pasa korišćeni su pozitivni i negativni serumi izabrani na osnovu ranijih testiranja AGID testom uz potvrdu PRNT-90 testom, „*in house*” IFA testom.

Izvođenje testa se sastojalo u sledećim koracima:

1. Priprema ispitujućih seruma u razređenju 1:10.
2. 30 µl ispitujućeg seruma i kontrolnih seruma je nanošeno u bazenčiće 2 polja (Vero *WNV* inficiranih ćelija i Vero normalnih ćelija kao interne kontrole).
3. Inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi (+18 °C do +25 °C)
4. Uklanjanje seruma ispiranjem ploča rastvorom PBS-Tween u mlazu, a potom potapanjem u kadicu sa rastvorom i mešanjem na magnenoj mešalici u trajanju od 5 minuta.
5. Brzo sušenje blagim prislanjanjem pločice na papirnu vatu bez skupljanja tečnosti na ili između reakcionih polja.
6. Nanošenje 25 µl fluorescein obeleženog anti vrsta imunoglobulina IgG klase na svako reakciono polje.
7. Inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi (+18 °C do +25 °C).
8. Uklanjanje fluorescein obeleženog anti vrsta imunoglobulina upotrebom novog PBS-Tween rastvora u mlazu, a potom potapanjem u kadicu sa rastvorom PBS-Tween-a u koji je dodata boja Evans plavo u količini 10 kapi na 150 ml pufera i mešanjem na magnetnoj mešalici u trajanju od 5 minuta.
9. Brzo sušenje blagim prislanjanjem pločice na papirnu vatu bez skupljanja tečnosti na ili između reakcionih polja.
10. Nanošenje glicerola i pokrovnog stakla.
11. Mikroskopiranje upotrebom fluorescentnog mikroskopa pod uveličanjem od 10x, 40x i 100x.

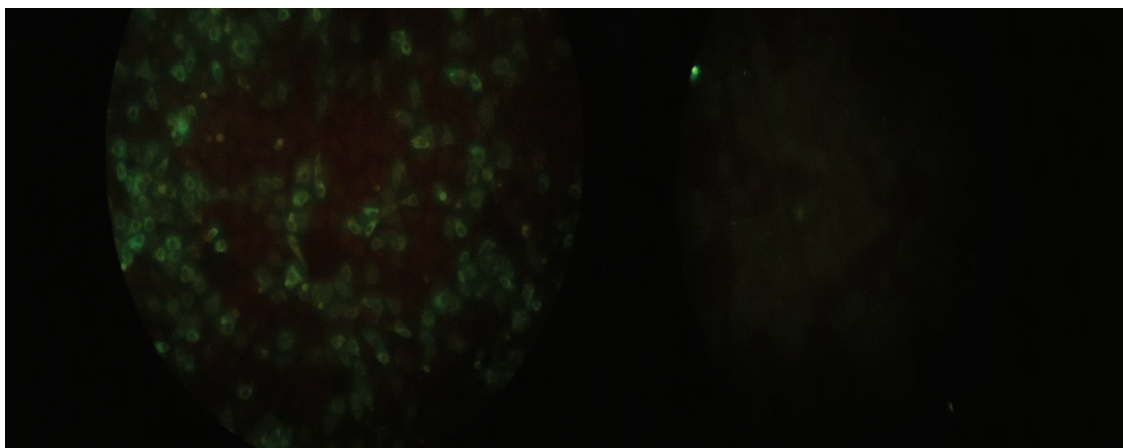
Evaluacija rezultata je vršena na osnovu uputstva proizvođača za kvalitativnu procenu, pri čemu se napominje da antitela protiv *WNV* izazivaju uočljivu fluorescenciju inficiranih ćelija u regiji citoplazme gde se uočavaju fine ili krupnije granularne strukture i inkluziona tela koje sadrže virusni material koji fluorescira.

1. U slučaju prisustva imunofluorescencije reakcija je pozitivna i ukazuje na tekuću ili prošlu infekciju sa *WNV*. Dobijena fluorescencija odgovara pozitivnoj kontroli.
2. U slučaju odsustva imunofluorescencije reakcija je negativna.
3. U slučaju prisustva imunofluorescencije na poljima Vero normalnih ćelija (negativne kontrole) ili odsustva specifične imunofluorescencije na poljima Vero *WNV* inficiranih ćelija (pozitivne kontrole) rezultati nisu validni.

Pri izvođenju svake reakcije procedura je verifikovana pozitivnim i negativnim kontrolama, kao i kontrolom razlike Vero *WNV* inficiranih ćelija i Vero normalnih ćelija kao interne kontrole (*Slika 10*).

Materijal potreban za izvođenje komercijalnog testa indirektno imunofluorescencije (IFA) obuhvata: pločice sa BIOCHIP tehnologijom obložene VERO *WNV* inficiranim ćelijama i VERO normalnim ćelijama, Evans plava boja (*Evans blue*), fluorecein obeležena anti humana IgG antitela, fluorecein obeležena anti konjska IgG antitela, fluorecein obeležena anti pseća IgG antitela, PBS, Tween 20, glicerol.

Od opreme su potrebni: pipete, nastavci za pipete, magnetne mešalice i magneti, posuda za ispiranje, pokrovna stakla, mikroskop sa fluorescencijom.



Slika 10. Prikaz reakcije komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije sa pozitivnim i negativnim kontrolnim serumom

4.2.4. Imunoenzimski metod (ELISA)

Imunoenzimski metod (ELISA) se bazira na dvostrukom vezivanju specifičnih primarnih antitela za antigen u čvrstoj fazi i sekundarnih enzimom obeleženih antitela koji izazivaju promenu boje reakcije koja se potom očitava pomoću spektrofotometra. Postoji nekoliko vrsta ELISA testova u zavisnosti od rasporeda vezivanja antigena i primarnih i sekundarnih antitela.

4.2.4.1. Priprema „in house“ imunoenzimskog indirektnog testa (ELISA)

Imunoenzimski indirektni ELISA test predstavlja test gde je antigen u čvrstoj fazi vezan za polistirensku mikrotitar ploču. Posle zaustavljanja vezivanja antigena za mikrotitar ploču, u bazenčiće mikrotitar ploče se nanose ispitujući serumi u razblaženju, a posle ispiranja i sekundarna enzimom obeležena antitela. Reakcija se uočava primenom supstrata i zaustavljanjem reakcije, te očitavanjem optičke gustine bazenčića pomoću spektrofotometra.

U pripremi antigena (*WNV* pozitivnog i negativnog) za „in house“ test korišćena je procedura opisana u radu Frazier and Shope, 1979 uz modifikacije.

Za pripremu negativnog antigena korišćena je 24-48h stara kultura RK-13 ćelija sa potpuno formiranim monoslojem ćelija. Flaskovi (*Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*) su zaleđeni i skladišteni na -18 °C do upotrebe, kada su posle procedure tri puta odmrzavanja i zamrzavanja pulirani u konačnu količinu od oko 60 ml sadržaja sa Eagle MEM podlogom (*Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Serbia*) sa dodatkom 5% fetalnog bovinog seruma (*PAA Laboratories, USA*).

Za pripremu *WNV* pozitivnog antigena korišćena je 24h stara RK-13 ćelijska kultura sa potpuno formiranim monoslojem ćelija inficirana sa *WNV*. Po pojavi 70-80% citopatogenog efekta flaskovi su zaleđeni i skladišteni na -18 °C do upotrebe, kada su posle procedure tri puta odmrzavanja i zamrzavanja pulirani u konačnu količinu od oko 160 ml sadržaja sa Eagle MEM podlogom (*Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Serbia*) sa dodatkom 5% fetalnog bovinog seruma (*PAA Laboratories, USA*). Sadržaj je podeljen u epruvete pogodne za centrifugiranje na velikom broju obrtaja (*Greiner Bio-One, Belgium*). Pre obavljanja procedure pripreme antigena pripremljen je svež rastvor STE pufera pH 7.2 prema sledećoj recepturi: NaCl 5,84 g/l, etilendiamintetraacetatna kiselina (EDTA) 0.37 g/l, tris –(hidroksimetil) aminometan-hidrohlid 1,21 g/l (*Merck Serono, Germany*).

Sama procedura pripreme antigena se sastojala u sledećim koracima:

1. Centrifugiranje u trajanju od 20 minuta na oko 17.000 x g (7000 rpm) u Sorvall Superseed centrifugi (*Sorvall Superseed RC2-B*) sa hlađenjem na +4 °C,
2. Filtracija kroz 0.20 µm filter,

3. Dodavanje 10% wv/vol polietilenglikola Mr 6000 (PEG Mr 6000, *Merck Serono, Germany*) i 2.3% w/v NaCl (*Merck Serono, Germany*),
4. Ekstrakcija u trajanju od 1h na +4 °C u frižideru,
5. Centrifugiranje u trajanju od 20 minuta na oko 28.000 x g (9000 rpm) u Sorvall Superseed centrifugi (*Sorvall Superseed RC2-B*) sa hlađenjem na +4°C,
6. Resuspendovanje sedimenta u STE puferu tako da konačna koncentracija antigena bude 50x.

Pre daljeg rada obavljenja je analiza proteinskog sadržaja u antigenima metodom po Lowry-ju u Laboratoriji Katedre za hemiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Procedura izvođenja „*in house*“ ELISA testa je opisana u radu Ebel et al., 2002.

Priprema rastvora je obuhvatala sledeće:

1. Rastvor za oblaganje bazenčića (*coating buffer*): Na₂CO₃ 1.59 g/l, NaHCO₃ 2,93 g/L, pH 9,6 (*Merck Serono, Germany*),
2. Rastvor za ispiranje PBS sa dodatkom 0.05% Tween 20 (*ICN Pharmaceuticals, USA*),
3. Blokirajući pufer PBS sa dodatkom 0.05% Tween 20 i 2,0% kazeina (obrano mleko u prahu),
4. Rastvor za razređivanje seruma i konjugata PBS sa dodatkom 0.05% Tween 20 i 0.5% govedeg serumskog albumina.

Korišćene su polistirenske mikrotitar ploče (ELISA microplates, U bottom Microlon, *Greiner Bio-One, Belgium*).

Određivanje radnog razređenja *WNV* antigena je obavljeno pomoću „šah-titracije“ sa sigurno pozitivnim i negativnim serumom. Određen je i odnos *WNV* antigena i negativnog antigena.

Sama procedura izvođenja reakcije obuhvata:

1. Nanošenje 50 µl antigena u bazenčiće na polistirenske mikrotitar ploče,
2. Inkubacija u vlažnoj komori preko noći na +4 °C u frižideru,
3. Trostruko ispiranje rastvorom za ispiranje,
4. Nanošenje 100 µl blokirajućeg pufera i inkubacija 1h u vlažnoj komori na +37 °C u termostatu,
5. Po inkubaciji odstranjen je blokirajući pufer i nanošena su razređenja ispitujućih seruma (1:100),

6. Inkubacija 1h u vlažnoj komori u termostatu na +37 °C,
7. Trostruko ispiranje rastvorom za ispiranje,
8. Nanošenje 50 µl konjugata - anti vrsta peroksidaza obeleženih antitela u razređenju preporučenom od strane proizvođača,
9. Inkubacija 1h u vlažnoj komori u termostatu na +37 °C,
10. Trostruko ispiranje rastvorom za ispiranje,
11. Nanošenje 50 µl tetrametilbenzidin (TMB)- peroksidaza supstrata,
12. Inkubacija 7 minuta u tamnoj komori na sobnoj temperaturi,
13. Stopiranje reakcije 1:20 rastvorom H₂PO₄,
14. Merenje optičke gustine uzoraka pomoću spektrofotometra.

Za izvođenje reakcije korišćeni su sledeće ingredience:

1. Peroksidaza konjugovana mišja anti-humana antitela klase IgG (*peroxidase-mouse anti-human IgG, Novex, Life technologies, Invitrogen, Camarillo, USA*) u razređenju 1: 1000 prema uputstvu proizvođača,
2. Peroksidaza konjugovana kozija anti-konjska antitela klase IgG (*goat anti horse IgG (H/L): HRP, AbD Serotec, Endeavour, UK*) u razređenju 1: 10000 prema uputstvu proizvođača,
3. Peroksidaza konjugovana pileća anti-mišija antitela klase IgG (*chicken anti mouse IgG (H/L):HRP Conjugate, affinity purifies, Novex, Life technologies,USA*) u razređenju 1: 2000 prema uputstvu proizvođača,
4. Peroksidaza konjugovana kozija anti-pseća antitela klase IgG (*goat anti -dog IgG (H+L) antibody, HRP Conjugate, affinity purifies, Novex, Life technologies,USA*) u razređenju 1:2000 prema uputstvu proizvođača,
5. TMB, *IDVet, France*,
6. Stop rastvor *IDVet, France*.

U radu je korišćena sledeća oprema: termostad, frižider, pipete, ELISA ispirać (*PW 41 Microplate washer Bio- Rad Laboratories, France*), ELISA čitać (*TEKAN, Austria ELISA reader*).

Po dobijanju rezultata optičke gustine (OD) uzoraka test je validiran posmatranjem količnika odnosa srednjih vrednosti optičke gustina pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma koji je morao da bude veći ili jednak vrednosti 2.

Granica pozitivnih i negativnih seruma je određivana na bazi metode opisane u radu Frey et al., 1998. godine koji opisuje određivanje granične vrednosti za imunoenzimske testove za koje nisu dostupni pozitivni standardi tj. kada nije tačno poznata granica pozitivnih, slabo pozitivnih i negativnih uzoraka već samo imamo vrednosti validacije testa. Procedura se bazira na izračunavanju gornje granice predviđanja upotrebom Student-t distribucije. Matematička formula se bazira na vrednosti standardne devijacije pomnožene sa faktorom koji se određuje na bazi negativnih kontrola i intervala pouzdanosti (1- α). U radu su dati intervali pouzdanosti od 2 do 30 negativnih kontrola za intervale pouzdanosti od 95.0.% do 99,0%. Standardna devijacija je izračunavana

prema formuli: $SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$, gde je SD - standardna devijacija, X -srednja vrednost optičke gustine negativnih uzoraka N - broj negativnih uzoraka. Granična vrednost optičke gustine uzoraka određena je na osnovu matematičke formule:

$Cutoff = Xsr + SDf$ gde je $f = t\sqrt{1+(1/n)}$ vrednost korekcionog faktora data u radu Frey i sar. 1998. i dobijena na osnovu kritičnih vrednosti jednostrane t- distribucije.

Za izračunavanje granične vrednosti koristili smo vrednost korekcionog f faktora za interval pouzdanosti od 95%.

Tradicionalni metodi definisanja granične vrednosti preko dodavanja dve ili tri standardne devijacije na srednju vrednost optičke gustine uzorka dovode u pitanje osetljivost testa (Classen et al., 1987). U radu se definiše granična vrednost na bazi srednje vrednosti optičke gustine uzoraka + 3 standarne devijacije na 28 kontrolnih seruma, gde po testiranju 60 sigurno negativnih seruma autori nisu dobili lažno pozitivne rezultate. Ovaj rezultat odgovara nivou pouzdanosti korekcionog f faktora od 99,5%. Iako je poželjno u pogledu specifičnosti testa korišćenjem visoke granične vrednosti u pogledu osetljivosti smanjuje se stopa stvarno pozitivnih uzoraka. Ovo pravilo je izuzetno izraženo u slučaju slabo pozitivnih uzoraka kada dobijena visoka granična vrednost može da stvori neprihvatljivo mnogo lažno negativnih uzoraka (Frey et al.,1998) te smo u radu koristili korekcioni faktor za nivo pouzdanosti od 95%.

4.2.4.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)

4.2.4.2.1 Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA) za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnim serumima konja i pasa

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela za *WNV* korišćen je komercijalni kit ID Screen West Nile Competition Multi-species, proizvođača *IDVet, France*. Test otkriva specifična antitela protiv proteina omotača *WNV* (PrE) u uzorcima krvnih seruma konja i ptica, a prema preporukama stručne službe proizvođača primenjen je i na uzorcima krvnih seruma poreklom od pasa. Ispitivanje seroprevalencije kod pasa komercijalnim kitom opisano je u radu *Lan i sar.* Ustanovljena je serokonverzija kod 21 (5,72%) od 367 ispitanih pasa komercijalnim *ELISA* testom. Pozitivni rezultati su potvrđeni testom redukcije plakova (*PRNT*), a nije ustanovljena statistička značajnost između upotrebljenih testova (Lan et al., 2011).

Proizvođač naglašava da monoklonska antitela koja su korišćena u ovom kitu imaju unakrsnu reaktivnost sa drugim virusima grupe Japanskog encefalitisa i virusom krpeljskog encefalitisa.

Princip rada kompetitivnog ELISA testa: mikrotitar ploča je obložena prečišćenim ekstraktom *WNV*. Ispitivani uzorci, kao i kontrole (pozitivna i negativna) koje su sastavni deo komercijalnog kita se dodaju u bazenčiće. U slučaju prisustva specifičnih antitela stvara se antigen-antitelo kompleks. Peroksidazom konjugovana antitela protiv proteina omotača (anti-prE antibody peroxidase (HRP) conjugate) se dodaju u bazenčiće. Ona zauzimaju slobodne prE epitope i formiraju antigen-konjugat- HRP kompleks. Posle ispiranja dodaje se rastvor supstrata (TMB) sa kojim reaguje enzim peroksidaza ukoliko je ostala, nakon ispiranja, vezana antitelima u bazenčićima. Boja koja se dobija zavisi od količine specifičnih antitela koja su prisutna u ispitivanim uzorcima. U odsustvu antitela pojavljuje se plava boja koja postaje žuta po dodavanju stop rastvora za zaustavljanje reakcije. U prisustvu antitela ne nastaje prebojavanje. Mikrotitar ploča se očitava na filteru od 450 nm.

Sama procedura izvođenja testa ima sledeće faze: dodavanje kontrola i uzoraka u razblaženju 1:100, inkubaciju, ispiranje, dodavanje konjugata, inkubacija, dodavanje

stop rastvora za zaustavljanje reakcije, očitavanje optičke gustine na čitaču. U svrhu izvođenja ove reakcije korišćena je sledeća oprema:

1. ELISA ispirać PW 41 Microplate washer *Bio- Rad Laboratories, France*
2. ELISA čitač *TEKAN, Austria* ELISA reader

Prema uputstvu proizvođača test je validan ako su zadovoljeni sledeći uslovi:

1. Srednja vrednost optičke gustine negativne kontrole mora da bude veća od 0.700
2. Srednja vrednost optičke gustine pozitivne kontrole mora da iznosi manje od 30% srednje vrednosti optičke gustine negativne kontrole.

Za izračunavanje vrednosti procenta količnika optičke gustine ispitivanog seruma i srednje vrednosti optičke gustine negativne kontrole primenjuje se sledeća formula:

$$S/N\% = OD \text{ uzorka} / OD \text{ negativne kontrole} \times 100$$

Procena rezultata se radi prema sledećem uputstvu:

1. Rezultat u procentima koji je manji ili jednak 40% smatra se pozitivnim rezultatom
2. Rezultat u procentima koji je veći od 40%, a manji ili jednak 50% je sumnjiv
3. Rezultat u procentima koji je veći od 50% smatra se negativnim.

Svi parametri validnosti testa su bili zadovoljeni kod testiranja uzoraka krvnih seruma konja i pasa primenom ELISA kita ovog proizvođača.

4.2.4.2.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA) za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnim serumima ljudi

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnim serumima ljudi korišćeni su komercijalno dostupni ELISA kitovi proizvođača *Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Germany* u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Korišćene su dve vrste testova: Anti-West Nile Virus ELISA (IgM) i Anti-West Nile Virus ELISA (IgG), *Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG*, prema uputstvu proizvođača. Korišćeno je razređenje seruma 1:100.

4.2.5. Geografsko mapiranje

Za geografsko mapiranje teritorija-regiona Republike Srbije gde su vršena ispitivanja i obeležavanje seropozitivnosti po životinjskim vrstama, odnosno čoveku korišćen je LunaPic Online Photo Editor.

4.2.6. Statistička obrada dobijenih rezultata

Polazna hipoteza o nepostojanju razlika između primenjenih “in house” i komercijalno dostupnih testova je ispitana primenom McNemar-ovog testa (χ^2 test).

McNemar-ov test se koristi za testiranje značajnosti razlike proporcija dva zavisna uzorka. On se primenjuje na tabelama kontigencije 2×2 sa dihotomnim varijablama i uparenim parovima subjekata, da ispita da li su marginalne frekvence redova i kolona jednake.

Tabele kontigencije prikazuju ishod na dva testa primenjena na n subjekata, a opšti izgled jedne ovakve tabele kontigencije dat je u *Tabeli 7*.

Tabela 7. Opšti izgled tabele kontigencije za McNemar-ov test

	Test 2 pozitivan	Test 2 negativan	Total
Test 1 pozitivan	a	b	$a + b$
Test 1 negativan	c	d	$c + d$
Total	$a + c$	$b + d$	n

Kod ovog testa, nulta i alternativna hipoteza se specificiraju na sledeći način:

$$H_0: p_b = p_c$$

$$H_a: p_b \neq p_c, \text{ gde su } p_b, p_c \text{ verovatnoće događaja u ćelijama } b \text{ i } c.$$

McNemar-ova statistika testa glasi: $\chi^2 = \frac{(b-c)^2}{b+c}$, koja u slučaju tačne nulte hipoteze, i za dovoljno velike vrednosti b i c , ima približno χ^2 raspodelu sa jednim stepenom slobode. Na osnovu realizacije statistike testa na bazi uzoraka, izračunava se p vrednost i ukoliko je ona manja onda se nulta hipoteza odbacuje.

Ukoliko b i c nisu dovoljno veliki, tada se statistika testa ne prikazuje na zadovoljavajući način χ^2 raspodelom. U tom slučaju se koristi binomna raspodela sa parametrima $n = b + c$ i $p = 0.5$. U tom slučaju se egzaktna p vrednost računa na sledeći način: $2 \sum_{i=0}^b \binom{n}{i} 0.5^i (1 - 0.5)^{n-i}$.

Analiza osetljivosti i specifičnosti “in house” testova rađena je na osnovu metode opisane u radu Enoe et al. (2000).

Kao parametri osetljivosti i specifičnosti komercijalno dostupnih testova korišćeni su sledeći podaci:

1. komercijalno dostupni test indirektno imunofluorescencije (*Euroimmun, Germany*): osetljivost 100%, specifičnost 98% (iz uputstva proizvođača dostupno na http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/tropen_UK.pdf)
2. komercijalno dostupni imunoenzimski IgG ELISA test (*Euroimmun, Germany*): osetljivost 99.5%, specifičnosti 97% (Niedrig M. et al., 2007)
3. komercijalno dostupni imunoenzimski WN anti prE ELISA test (*IdVet, France*): osetljivost 100%, specifičnosti 100% (iz uputstva proizvođača dostupno na www.id-vet.com)

Statistička obrada dobijenih rezultata rađena je u programima Microsoft Excell 2010 (*Microsoft, USA*) i SPSS Statistics 20 (*IBM, USA*).

5. REZULTATI

5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA PO LOWRY-U (*FOLIN-CIOCALTEU METHOD*)

Određivanje koncentracije proteina po Lowry-u (*Folin-Ciocalteu method*) u uzorcima “*in house*” koncentrovanog antigena za imunoenzimski test urađeno je u laboratoriji Katedre za hemiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Rezultat je pokazao da koncentrovani antigen ima koncentraciju ukupnih proteina od 2,529 mg/ml.

5.2. KRVNI SERUMI LJUDI

Krvni serumi ljudi uzorkovani su na Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra u Beogradu. Svi pacijenti su bili hospitalizovani usled pojave izraženih neuroinvazivnih kliničkih simptoma tokom epidemije groznice Zapadnog Nila 2012. i 2013. godine, a dan uzorkovanja krvnih seruma se razlikovao od uzorka do uzorka u odnosu na dan hospitalizacije pacijenta od pojave kliničkih simptoma (*Tabela 8, prilog I*).

Tabela 8. Broj uzoraka krvnih seruma ljudi po godini uzorkovanja

	Broj uzoraka krvnih seruma ljudi	Procenat u odnosu na ukupan broj uzoraka (%)
2012. godina	41	26,8
2013. godina	112	73,2
Ukupno	153	100,0

5.2.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)



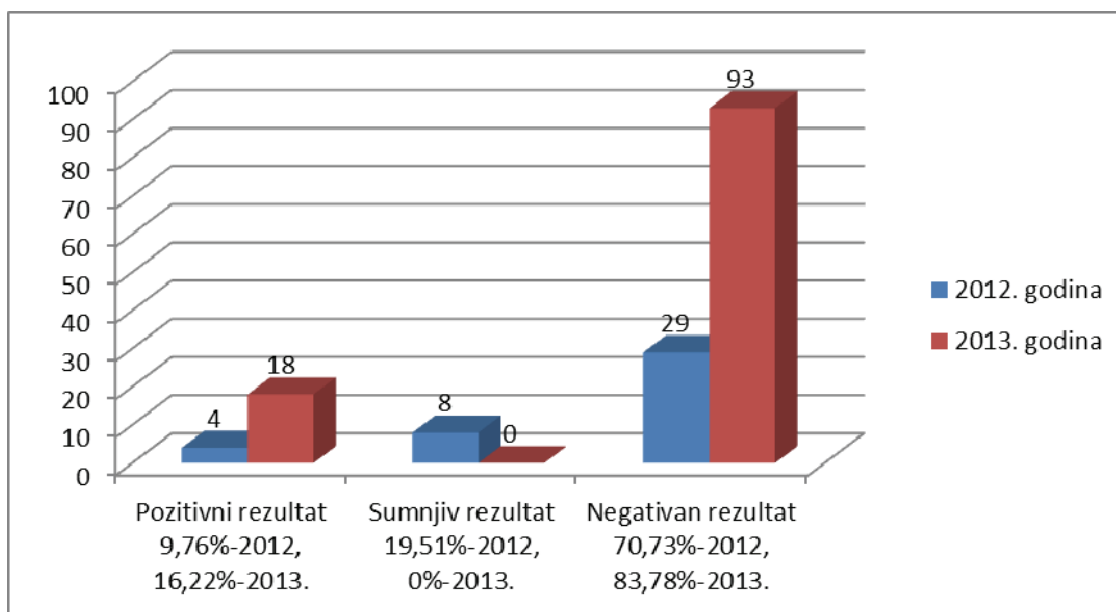
Slika 11. Prikaz pozitivne reakcije pozitivnih kontrolnih seruma i negativne reakcije negativnog kontrolnog seruma

Metodom agar gel imunodifuzije (AGID) pregledano je ukupno 152 krvna seruma ljudi, a u *Tabeli 9* su prikazani zbirni rezultati pregleda po godinama. Na *Slici 11* je prikazana reakcija kontrolnih seruma agar gel imunodifuzionim testom, dok je na *Slici 12* prikazana pozitivna reakcija ispitivanog seruma čoveka.

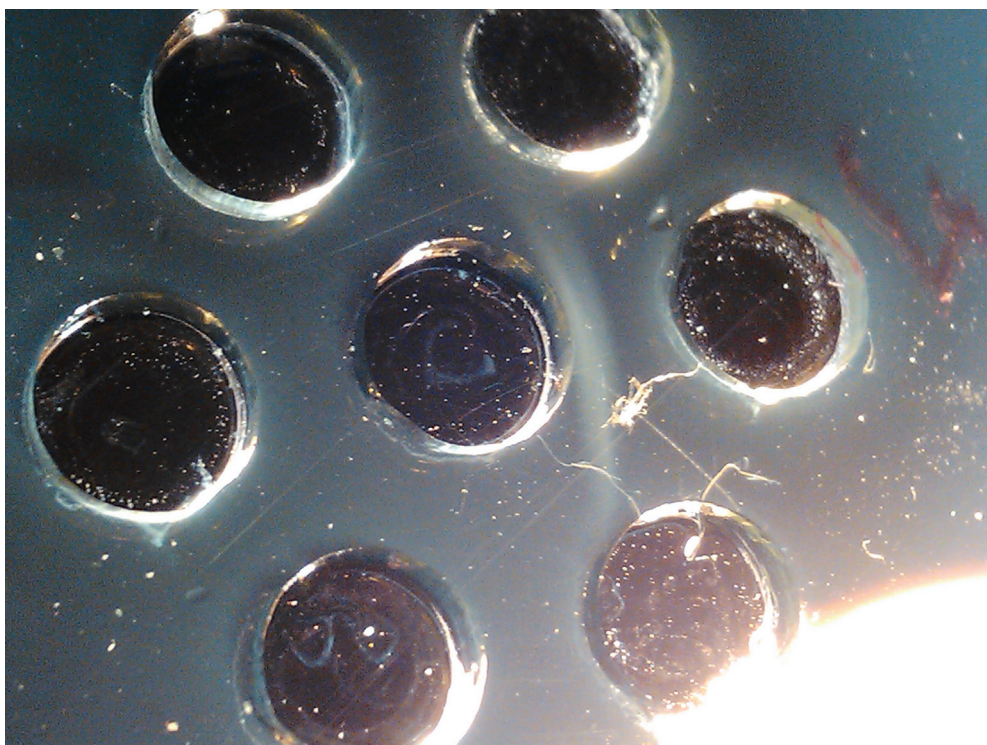
Tabela 9. Zbirni rezultati dobijeni primenom agar gel imunodifuzionog testa na krvnim serumima ljudi (AGID)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	41	4	9,76	8	19,51	29	70,73
2013. god.	111	18	16,22	0	0	93	83,78
Ukupno	152	22	14,47	8	5,27	122	80,26

Grafikon 1 predstavlja grafički prikaz rezultata agar gel imunodifuzionog testa (AGID) krvnih seruma ljudi po godini uzorkovanja.



Grafikon 1. Rezultati agar gel imunodifuzionog testa (AGID) krvnih seruma ljudi po godini uzorkovanja

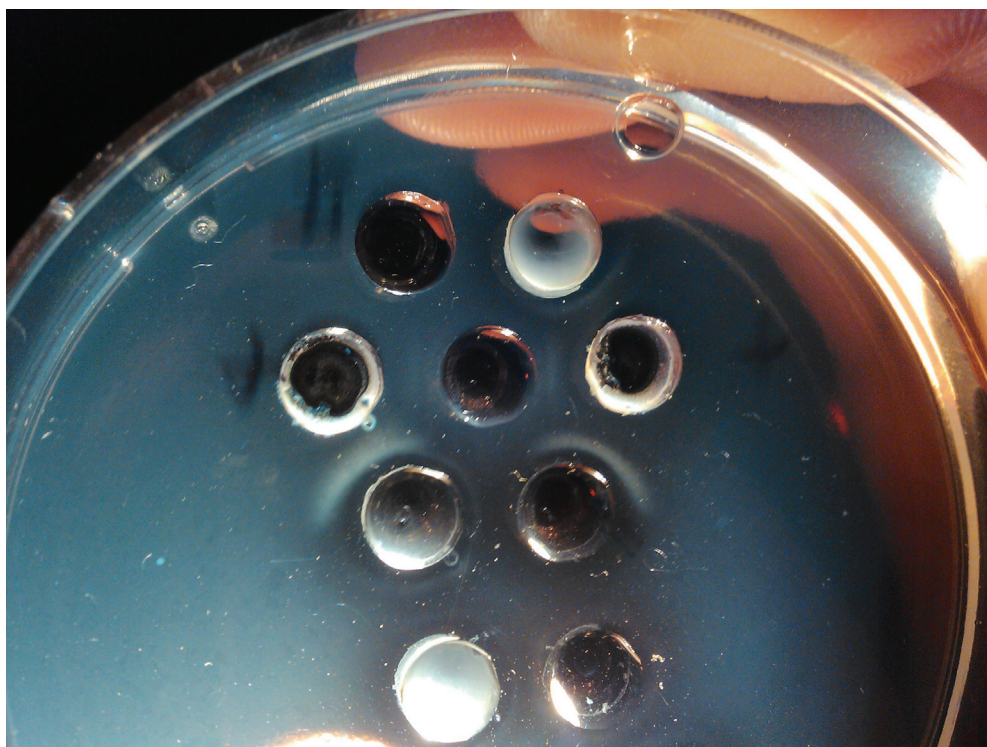


Slika 12. Prikaz pozitivne reakcije agar gel imunodifuzionog testa na uzorku seruma ljudi

U ukupno 9 ispitivanih uzoraka krvnih seruma ljudi uzorkovanih tokom 2013. godine zabeležena je pojava reakcije ispitivanog seruma sa negativnim (2 krvna seruma) i pozitivnim (5 krvnih seruma) kontrolnim serumom napravljenom imunizacijom miševa, te pojava zone inhibicije reakcije u okolini seruma u 2 slučaja ispitivanih seruma, što je prikazano u *Tabli 10* i *Slici 13*.

Tabela 10. Prikaz zabeleženih reakcija ispitivanih krvnih seruma ljudi sa pozitivnim, negativnim kontrolnim serumom i pojava zone inhibicije reakcije u okruženju seruma

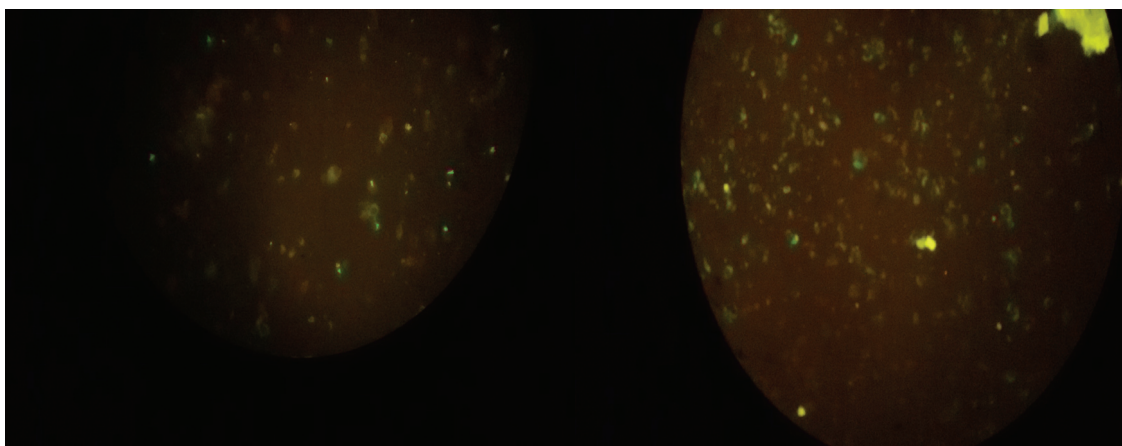
Godina uzorkovanja	Ukupan br. pregledanih uzoraka	Reakcija sa pozitivnim kontrolnim serumom	Reakcija sa negativnim kontrolnim serumom	Pojava zone inhibicije reakcije oko ispitivanog seruma
2012. god.	41	0	0	0
2013. god.	111	5	2	2
Ukupno	152	5	2	2



Slika 13. Prikaz reakcije ispitivanih seruma ljudi sa pozitivnim kontrolnim serumom miša

5.2.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)

5.2.2.1. „In house“ test indirektne imunofluorescencije



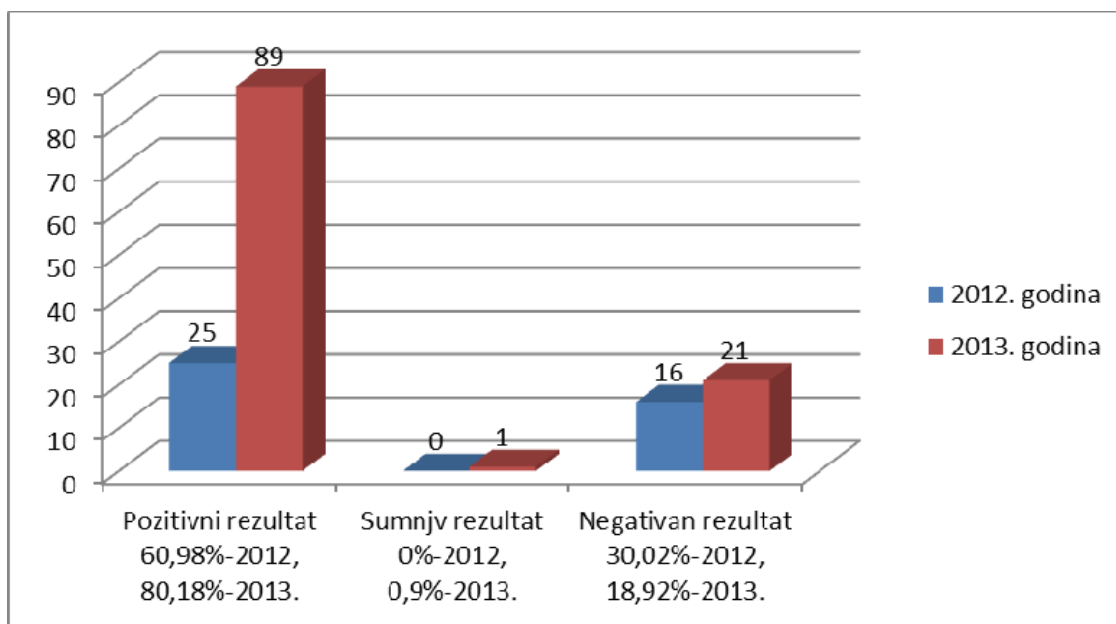
Slika 14. Prikaz pozitivne reakcije seruma čoveka primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije

Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi po godini uzorkovanja primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije prikazani su u *Tabeli 11*. Na *Slici 14* prikazane su reakcije pozitivnih seruma ljudi primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije

Tabela 11. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi dobijeni primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije prikazani po godini uzorkovanja

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	41	25	60,98	0	0	16	39,02
2013. god.	111	89	80,18	1	0,9	21	18,92
Ukupno	152	114	75,0	1	0,66	37	24,34

Na *grafikonu 2.* prikazani su rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi „*in house*“ testom indirektno imunofluorescencije (IFA) po godini uzorkovanja.



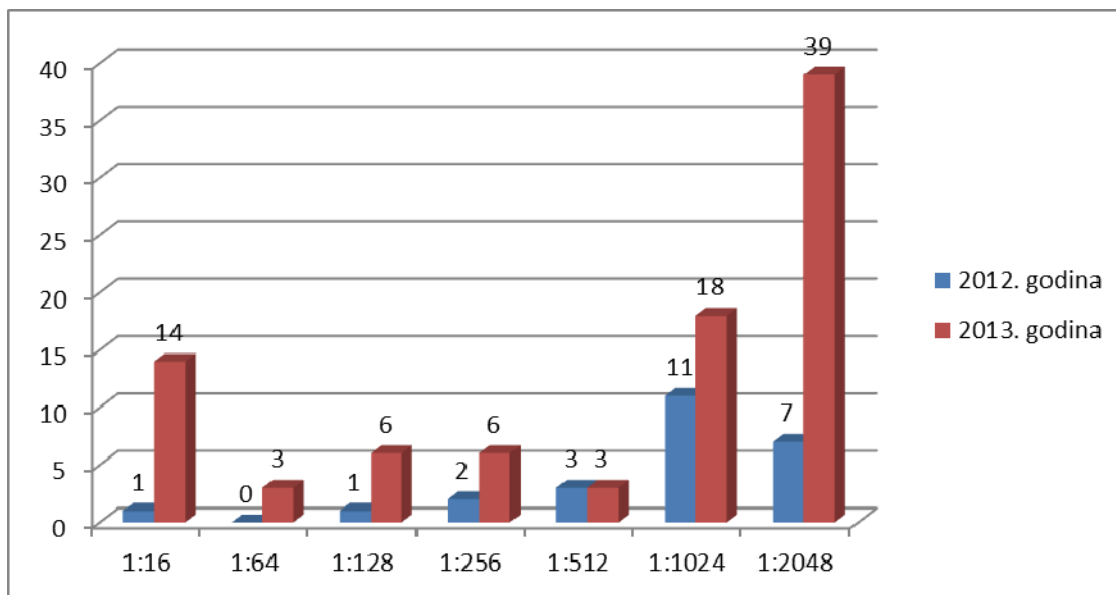
Grafikon 2. Prikaz rezultata ispitivanja krvnih seruma ljudi „*in house*“ testom indirektno imunofluorescencije (IFA) po godini uzorkovanja

Tabela 12. Broj uzoraka krvnih seruma ljudi po godini uzorkovanja sa utvrđenim titrima specifičnih antitela za *WNV* u reakciji „*in house*“ indirektno imunofluorescencije (IFA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Titar 1:16	Titar 1:64	Titar 1:128	Titar 1:256	Titar 1:512	Titar 1:1024	Titar 1:2048
2012. god.	41	25	60,98	1	0	1	2	3	11	7
2013. god.	111	89	80,18	14	3	6	6	3	18	39
Ukupno	152	114	75,0	15	3	7	8	6	29	46

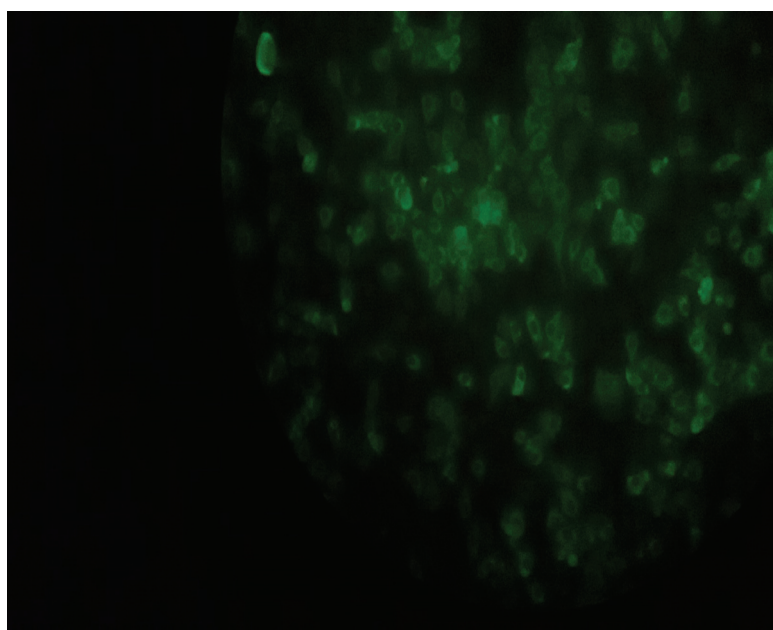
Pri titraciji ispitivanih krvnih seruma ljudi koji su prethodno u skrining testiranju reagovali pozitivnom reakcijom u razblaženju seruma 1:16, 1:64, primenjena su sledeća razblaženja 1:16, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048. Broj uzoraka krvnih seruma ljudi po godini sa utvrđenim titrima specifičnih antitela za *WNV* prikazani su u *Tabeli 12.*

Na *grafikonu 3*. Prikazan je broj krvnih seruma ljudi po titraciji metodom „*in house*“ testa indirektna imunofluorescencije (IFA).



Grafikon 3. Prikaz broja krvnih seruma ljudi po titraciji metodom „*in house*“ testa indirektna imunofluorescencije (IFA)

5.2.2.2. Komercijalno dostupan test indirektna imunofluorescencije



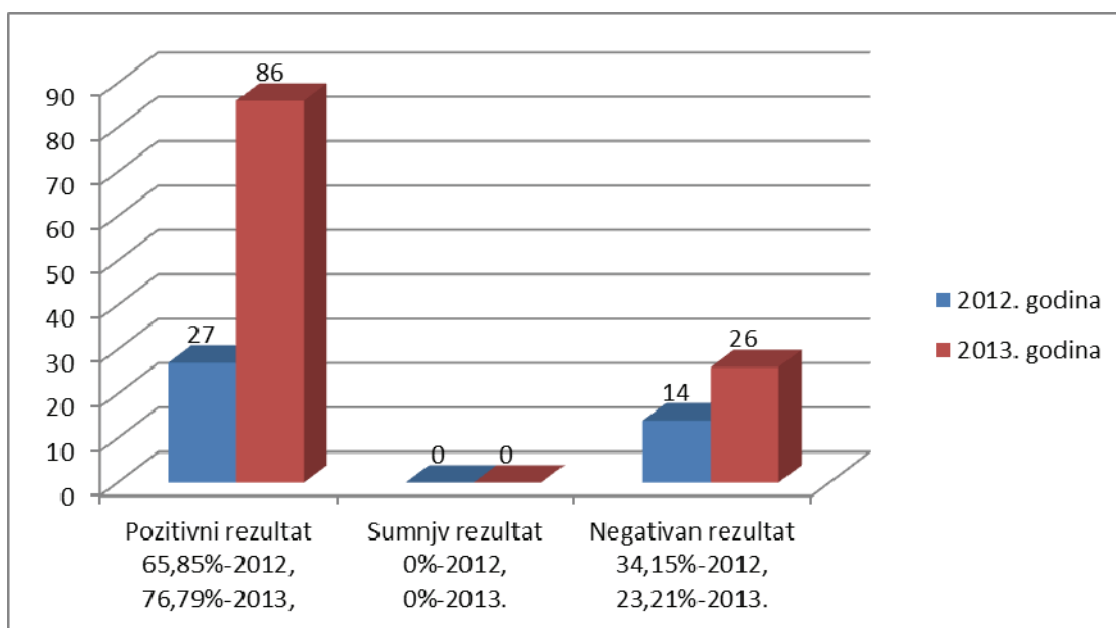
Slika 15. Prikaz pozitivne reakcije seruma čoveka komercijalno dostupnim testom indirektna imunofluorescencije

Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* po godini uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije prikazani su u *Tabeli 13*. Na *Slici 15* prikazana je reakcija pozitivnog seruma čoveka primenom komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije.

Tabela 13. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* dobijeni primenom komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	41	27	65,85	0	0	14	34,15
2013. god.	112	86	76,79	0	0	26	23,21
Ukupno	153	113	73,86	0	0	40	26,14

Na *grafikonu 4*. prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim testom indirektno imunofluorescencije (IFA) po godini uzorkovanja.



Grafikon 4. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim testom indirektno imunofluorescencije (IFA) po godini uzorkovanja

5.2.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)

5.2.3.1. „In house“ imunoenzimski test (ELISA)

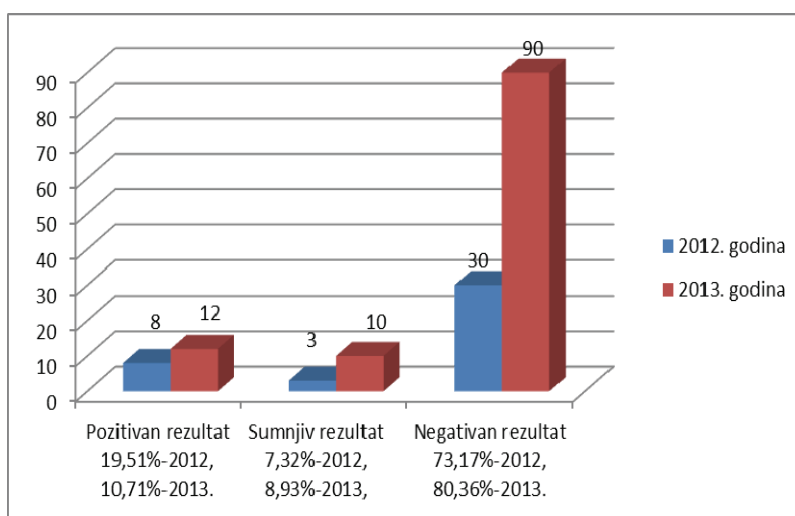
Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 po godini uzorkovanja primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 14*.

Tabela 14. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 dobijeni primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Pregledani uzorci	Pozitivan rezultat	Pozitivni rezultati (%)	Sumnjiv rezultat	Sumnjivi rezultati (%)	Negativan rezultat	Negativni rezultati (%)
2012. god.	41	8	19.51	3	7.32	30	73.17
2013. god.	112	12	10.71	10	8.93	90	80.36
Ukupno	153	20	13.07	13	8.5	120	78.43

Ukupno je pregledano 153 uzoraka, a pozitivna reakcija je zabeležena u 19,51% uzoraka tokom 2012. godine, odnosno 10,71% tokom 2013. godine. Procenat uzoraka koji su bili u zoni sumnjive reakcije je iznosio 7,32% u 2012. godini i 8,93% u 2013.godini.

Na *grafikonu 5*. su prikazani rezultati pregleda krvnih seruma ljudi „in house“ imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja.



Grafikon 5. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma ljudi „in house“ imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja

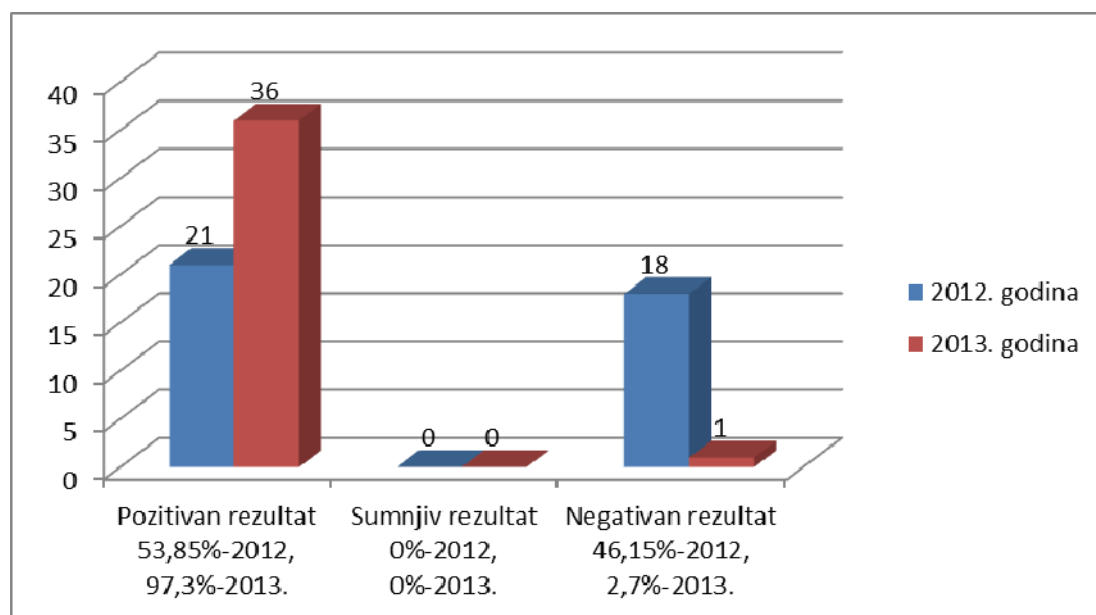
5.2.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)

Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgM antitela za *WNV* u razređenju 1:100 po godinama uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 15*.

Tabela 15. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgM antitela za *WNV* u razređenju 1:100 dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	39	21	53.85	0	0	18	46.15
2013. god.	37	36	97.3	0	0	1	2.7
Ukupno	76	57	75.0	0	0	19	25.0

Na *grafikonu 6*. prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim IgM imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja.



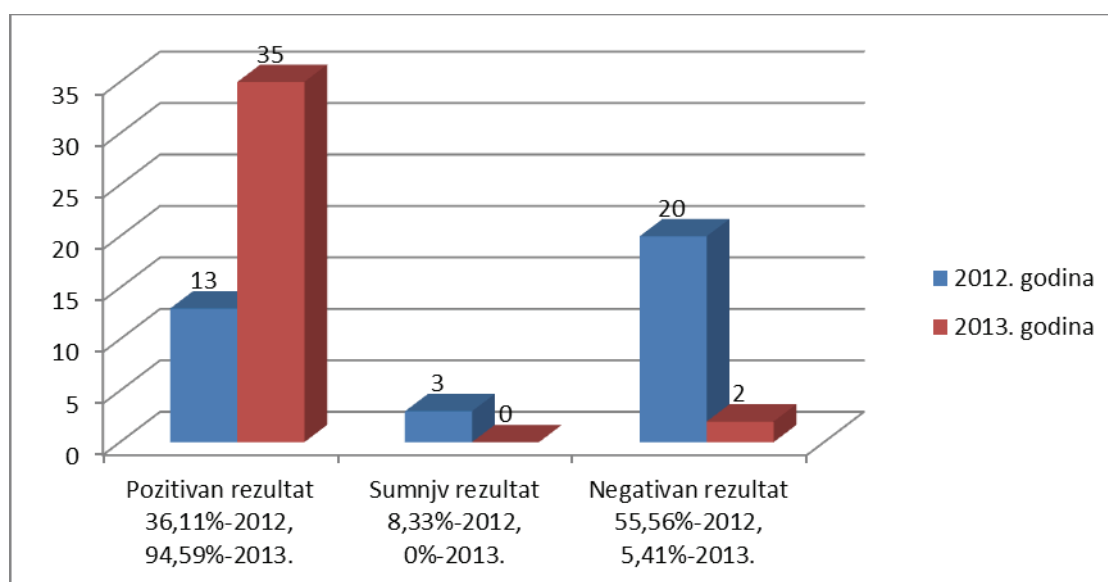
Grafikon 6. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim IgM imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja.

Rezultati ispitivanja likvora ljudi na prisustvo specifičnih IgM antitela za *WNV* po godinama uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 16*.

Tabela 16. Zbirni rezultati ispitivanja likvora ljudi na prisustvo specifičnih IgM antitela za *WNV* dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	36	13	36,11	3	8,33	20	55,56
2013. god.	37	35	94,59	0	0	2	5,41
Ukupno	73	48	65,75	3	4,11	22	30,14

Na *grafikonu 7*. Prikazani su rezultati pregleda likvora ljudi komercijalno dostupnim IgM imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja.



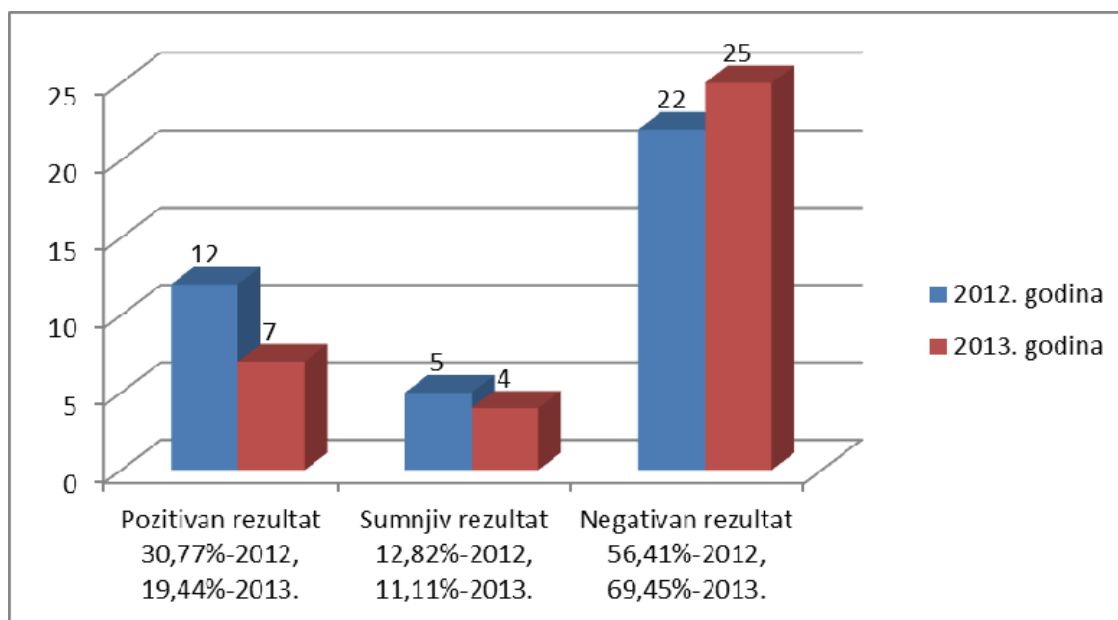
Grafikon 7. Prikaz rezultata pregleda cerebrospinalne tečnosti ljudi komercijalno dostupnim IgM imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja

Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 po godini uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 17*.

Tabela 17. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2012. god.	39	12	30,77	5	12,82	22	56,41
2013. god.	36	7	19,44	4	11,11	25	69,45
Ukupno	75	19	25,33	9	12,0	47	62,67

Na *grafikonu 8*. Prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim IgG imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja.



Grafikon 8. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma ljudi komercijalno dostupnim IgG imunoenzimskim (ELISA) testom po godini uzorkovanja

U tabeli 18. dati su zbirni rezultati prisustva *WNV* antitela u krvnim serumima ljudi tokom godina ispitivanja primenom 7 dijagnostičkih testova

Tabela 18. Zbirni rezultati prisustva *WNV* antitela u krvnim serumima ljudi tokom godina ispitivanja primenom 7 dijagnostičkih testova

Godina uzorkovanja krvnih seruma ljudi	Uzorkovano seruma	AGID	IFA „in house“	IFA komercijalna	ELISA „in house“	ELISA komercijalna IgG	ELISA komercijalna IgM	ELISA komercijalna IgM CSF
2012.	41	4/41 (9,76%)	25/41 (60,98%)	27/41 (65,85%)	8/41 (19,51%)	21/39 (53,85%)	12/39 (30,77%)	13/36 (36,11%)
2013.	112	18/111 (16,22%)	89/111 (80,18%)	86/112 (76,79%)	12/112 (10,71%)	36/37 (97,3%)	7/36 (19,44%)	35/37 (94,59%)
Ukupno	153	22/152 (14,47%)	114/152 (75,0%)	113/153 (73,85%)	20/153 (13,07%)	57/76 (75,0%)	19/75 (25,33%)	48/73 (65,75%)

5.2.4. Uporedni rezultati dijagnostičnih testova na krvnim serumima ljudi

Uporedni rezultati dijagnostičnih testova (agar gel imunodifuzioni test, „in house“ test indirektne imunofluorescencije, komercijano dostupan test indirektne imunofluorescencije, „in house“ imunoenzimski test (IgG), komercijalno dostupan imunoenzimski test (IgG i IgM)) na uzorcima krvnih seruma ljudi dati su u PRILOGU 1 (Tabela 1 . i Tabela 2)

5.2.5. Statistička analiza rezultata

Utvrđivanje statističke značajnosti dijagnostičkih testova rađeno je McNemar-ovom metodom.

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ testa indirektne imunofluorescencije (IFA) sa komercijalno dostupnim testom indirektne imunofluorescencije (IFA) su pokazali da između dva testa korišćenih za detekciju antitela u krvnim serumima ljudi ne postoji statistički značajna razlika ($\chi^2 = 0.148, p = 0.700$), što je prikazano na izvodima ispod:

IFA in house * IFA komercijalna Crosstabulation				
Count		IFAKomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
IFAIHouse	negativan	25	12	37
	pozitivan	15	99	114
Total		40	111	151

Test Statistics ^a	
	IFAIHouse & IFAKomercijalna
N	151
Chi-Square ^b	.148
Asymp. Sig.	.700

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ imunoenzimskog IgG testa (ELISA) sa komercijalno dostupnim imunoenzimskim IgG testom (ELISA) su pokazali da između dva testa korišćenih za detekciju antitela u krvnim serumima ljudi ne postoji statistički značajna razlika ($p=0.359$), što je prikazano na izvodima ispod:

ELISA in house * ELISA komercijalna IgG Crosstabulation

Count

		ELISAKomercijalnaIgG		Total
		negativan	pozitivan	
ELISAInHouse	negativan	38	12	50
	pozitivan	7	3	10
Total		45	15	60

Test Statistics^a

		ELISAInHouse & ELISAKomercijalnaIgG
N		60
Exact Sig. (2-tailed)		.359 ^b

a. McNemar Test
b. Binomial distribution used.

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ imunoenzimskog IgG testa (ELISA) sa komercijalno dostupnim imunoenzimskim IgM testom (ELISA) su pokazali da između dva testa rađena na krvnim serumima ljudi postoji statistički značajna razlika ($\chi^2 = 28.265, p < 0.001$) što je prikazano na izvodima ispod:

ELISA in house * ELISA IgM CSF Crosstabulation

Count

		ELISAIgMCSF		Total
		negativan	pozitivan	
ELISAInHouse	negativan	19	33	52
	pozitivan	1	7	8
Total		20	40	60

Test Statistics^a

		ELISAInHouse & ELISAIgMCSF
N		60
Chi-Square ^b		28.265
Asymp. Sig.		.000

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

Poređenjem dijagnostičke vrednosti agar gel imunodifuzionog testa (AGID) sa imunoenzimskim testom (ELISA) i testom indirektno imunofluorescencije (IFA) kako „in house“ tako i komercijalno dostupnog, pokazalo je da ne postoje statistički značajne razlike samo između AGID i „in house“ ELISA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG testa, što je prikazano ispod:

AGID * IFA in house Crosstabulation

Count

		IFAIHouse		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	29	92	121
	pozitivan	4	18	22
Total		33	110	143

AGID * IFA komercijalna Crosstabulation

Count

		IFAKomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	35	87	122
	pozitivan	2	20	22
Total		37	107	144

AGID * ELISA in house Crosstabulation

Count

		ELISAIHouse		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	98	12	110
	pozitivan	15	6	21
Total		113	18	131

AGID * ELISA komercijalna IgG Crosstabulation

Count

		ELISAKomercijalnaIgG		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	40	13	53
	pozitivan	6	2	8
Total		46	15	61

AGID * ELISA komercijalna IgM Crosstabulation

Count

		ELISAKomercijalnaIgM		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	13	48	61
	pozitivan	2	6	8
Total		15	54	69

AGID * ELISA IgM CSF Crosstabulation

Count

		ELISAIgMCSF		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	16	42	58
	pozitivan	3	5	8
Total		19	47	66

Test Statistics^a

	AGID & IFAInHouse	AGID & IFAKomercijalna	AGID & ELISAInHouse	AGID & ELISAKomercijalnaIgG	AGID & ELISAKomercijalnaIgM	AGID & ELISAIgMCSF
N	143	144	131	61	69	66
Chi-Square ^b	78.844	79.281	.148		40.500	32.089
Asymp. Sig.	.000	.000	.700		.000	.000
Exact Sig. (2-tailed)				.167 ^c		

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected
c. Binomial distribution used.

5.2.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al., 2000

Upoređivanjem rezultata dijagnostičkih testova preko metoda opisanih od strane Enoe et al., 2000 na ukupnom broju uzoraka seruma ljudi iz 2012. i 2013. godine dobijeni su sledeći rezultati:

„*In house*“ test indirektne imunofluorescencije u poređenju sa komercijalno dostupnim testom: Osetljivost 89%; specifičnost 62%.

„*In house*“ imunoenzimski test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom: Osetljivost 20%; specifičnost 84%.

Agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ testom indirektne imunofluorescencije: Osetljivost 17%; Specifičnost 94,5%.

Agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ imunoenzimskim testom: Osetljivost 13,2%; specifičnost 86,8%.

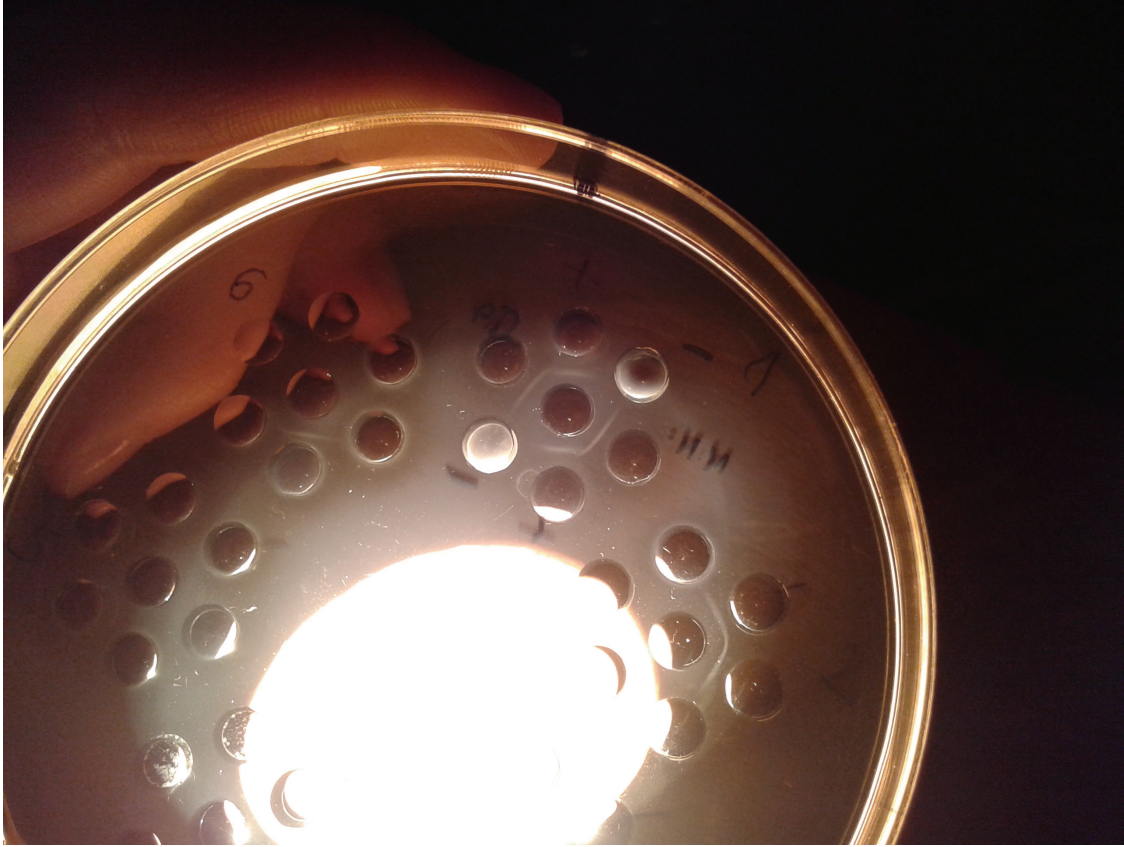
5.3. KRVNI SERUMI KONJA

Uzorci krvnih seruma konja uzorkovani su u periodu od 2011.-2013. godine na 10 izabраниh lokaliteta na teritoriji Republike Srbije (*Tabela 19*).

Tabela 19. Lokaliteti i broj uzoraka krvnih seruma konja po godini uzorkovanja

	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma konja	Procenat (%) od ukupnog broja uzorkovanih krvnih seruma konja po godini
2011. godina	Požarevac-hipodrom	5	
	Beograd-hipodrom	16	
Ukupno 2011. god.	2	21	6,93
2012. godina	Požarevac-hipodrom	10	
	Šabac-hipodrom	30	
	Subotica	1	
	Beograd-šira teritorija privatno	156	
Ukupno 2012. god.	4	197	65,02
2013. godina	Stara Planina-Gornji Krivodol	17	
	Pančevo-hipodrom	5	
	Leskovac-hipodrom	12	
	Banatski Karlovac	17	
	Novi Sad-šira teritorija	7	
	Bačka Topola (Zobnatica) ergela	12	
	Sremska Mitrovica-KPZ	15	
Ukupno 2013. god.	7	85	28,02
Ukupno	10	303	100

5.3.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)



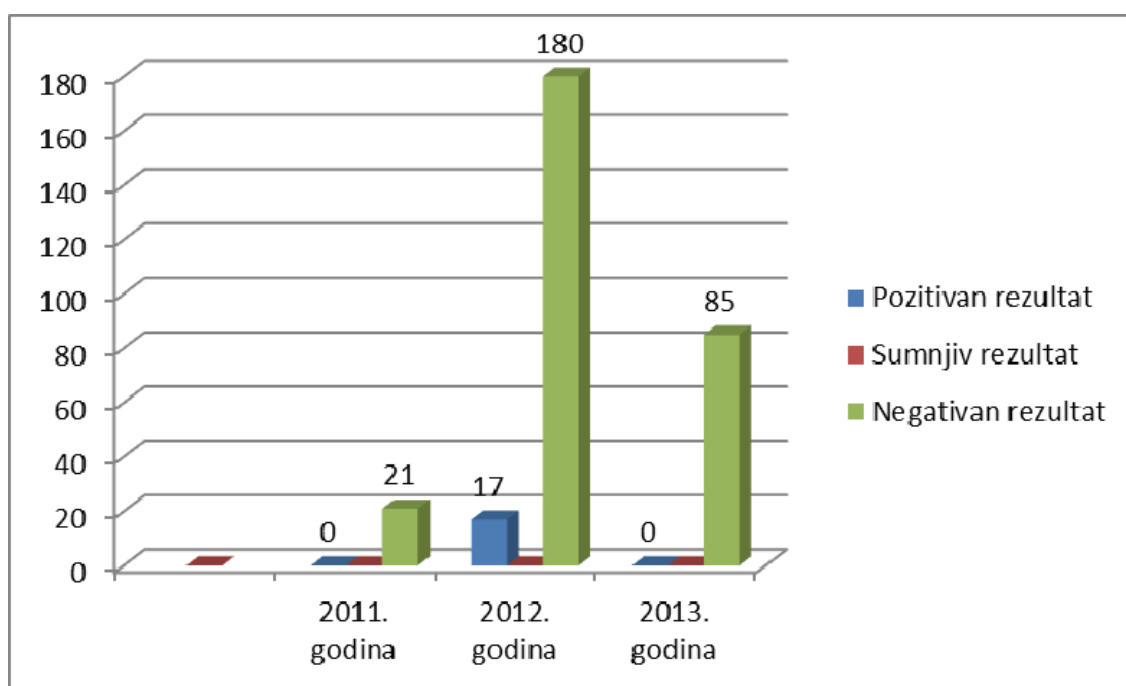
Slika 16. Prikaz pozitivnih kontrolnih reakcija krvnih seruma konja i specifičnog poliklonskog seruma miša (1) i pozitivnih reakcija ispitivanih seruma konja (2 i 6)

Metodom agar gel imunodifuzije (AGID) pregledano je ukupno 303 krvna seruma, a u *Tabeli 20.* su prikazani zbirni rezultati pregleda po godini. Na *slici 16* nalazi se prikaz pozitivnih kontrolnih reakcija krvnih seruma konja i specifičnog poliklonskog seruma miša (1) i pozitivnih reakcija ispitivanih seruma konja (2 i 6).

Tabela 20. Zbirni rezultati pregleda krvnih seruma konja dobijeni primenom agar gel imunodifuzionog testa (AGID)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	21	0	0	0	0	21	100
2012. god.	197	17	8,63	0	0	180	91,37
2013. god.	85	0	0	0	0	85	100
Ukupno	303	17	5,61	0	0	286	94,39

Na grafikonu 9. Prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma konja agar gel imunodifuzionim testom (AGID) po godini uzorkovanja.



Grafikon 9. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma konja agar gel imunodifuzionim testom po godini uzorkovanja

Rezultati pregleda krvnih seruma konja u odnosu na lokalitet uzorkovanja dati su u *Tabeli 21.*

Tabela 21. Rezultati pregleda krvnih seruma konja u odnosu na lokalitet

Godina	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma konja	Pozitivno	Procenat pozitivnih uzoraka (%)	Negativno	Procenat negativnih uzoraka (%)
2011. god.	Požarevac	5	0	0	5	100
	Beograd	16	0	0	16	100
Ukupno 2011. god.	2	21	0	0	21	100
2012. god.	Požarevac	10	1	10	9	90
	Šabac	30	1	3,33	29	96,67
	Subotica	1	0	0	1	100
	Beograd	156	15	9,62	141	90,38
Ukupno 2012. god.	4	197	17	8,63	180	91,37
2013. god.	Stara Planina	17	0	0	17	100
	Pančevo	5	0	0	5	100
	Leskovac	12	0	0	12	100
	Banatski Karlovac	17	0	0	17	100
	Novi Sad	7	0	0	7	100
	Bačka Topola	12	0	0	12	100
	Sremska Mitrovica	15	0	0	15	100
Ukupno 2013. god.	7	85	0	0	85	100
Ukupno	10	303	17	5,61	286	94,39

5.3.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)

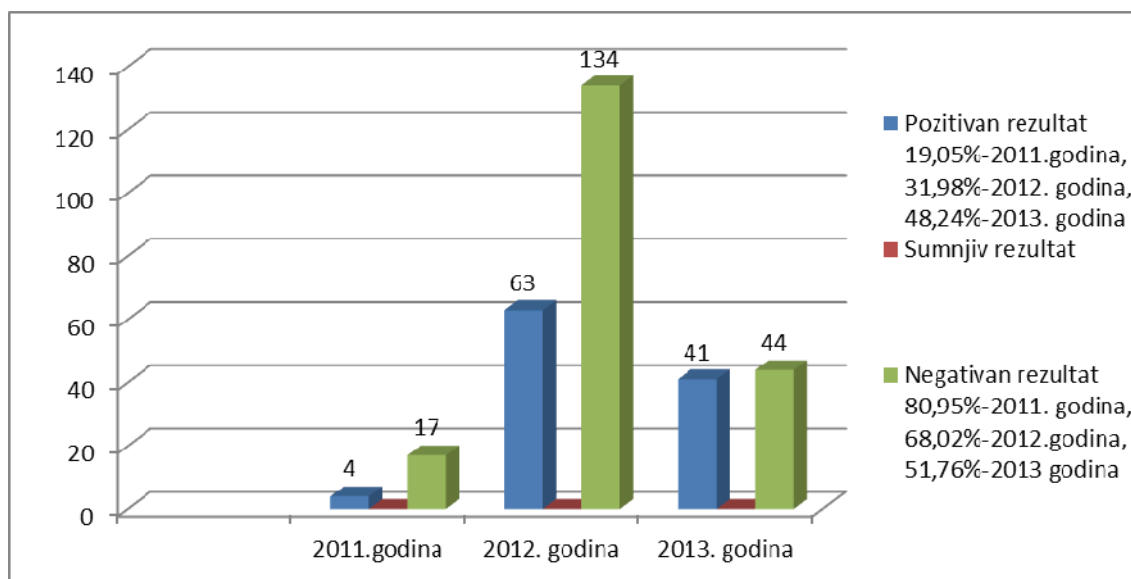
5.3.2.1. „In house“ test indirektne imunofluorescencije

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja po godinama uzorkovanja primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije prikazani su u Tabeli 22.

Tabela 22. Zbirni rezultati pregleda krvnih seruma konja dobijeni primenom „in house“ testa indirektne imunofluorescencije (IFA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	21	4	19,05	0	0	17	80,95
2012. god.	197	63	31,98	0	0	134	68,02
2013. god.	85	41	48,24	0	0	44	51,76
Ukupno	303	108	35,64	0	0	195	64,36

Na grafikonu 10. prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma konja „in house“ testom indirektne imunofluorescencije po godini uzorkovanja



Grafikon 10. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma konja „in house“ testom indirektne imunofluorescencije po godini uzorkovanja

Pri titraciji ispitivanih krvnih seruma konja koji su prethodno u skrining testiranju reagovali pozitivnom u razblaženju seruma 1:16, 1:64, primenjeno je razblaženje u PBS u razmeri 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, a broj uzoraka krvnih seruma ljudi po godinama sa zabeleženim titrima specifičnih antitela za *WNV* prikazani su u *Tabeli 23*.

Tabela 23. Broj uzoraka krvnih seruma konja po godinama uzorkovanja sa zabeleženim titrovima specifičnih antitela za *WNV* u reakciji „in house“ indirektne imunofluorescencije (IFA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivni rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Titar 1:16	Titar 1:32	Titar 1:64	Titar 1:128	Titar 1:256	Titar 1:512	Titar 1:1024	Titar 1:2048
2011.	21	4	19,05	2	0	2	0	0	0	0	0
2012.	197	63	31,98	23	6	14	7	5	4	3	1
2013.	85	41	48,24	21	7	6	1	3	2	1	0
Ukupno	303	108	35,64	46	12	22	8	8	6	4	1

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja po godini i lokalitetima uzorkovanja primenom „in house“ testa indirektno imunofluorescencije (IFA) prikazani su u *Tabeli 24.*

Tabela 24. Zbirni rezultati pregleda krvnih seruma konja dobijeni primenom „in house“ testa indirektno imunofluorescencije (IFA) po lokalitetima

Godina	Lokalitet	Br. uzoraka konja	Pozitivno	Procenat pozitivnih uzoraka (%)	Negativno	Procenat negativnih uzoraka (%)
2011. god.	Požarevac	5	0	0	5	100
	Beograd	16	4	25,0	12	75,0
Ukupno 2011. god.	2	21	4	19,05	17	80,95
2012. god.	Požarevac	10	1	10	9	90
	Šabac	30	2	6,67	28	93,33
	Subotica	1	0	0	1	100
	Beograd	156	60	38,46	96	61,54
Ukupno 2012. god.	4	197	63	31,98	134	68,02
2013. god.	Stara Planina	17	1		16	
	Pančevo	5	4	80,0	1	20,0
	Leskovac	12	3	25,0	9	75,0
	Banatski Karlovac	17	9	52,94	8	47,06
	Novi Sad	7	5	71,43	2	28,57
	Bačka Topola	12	8	66,67	4	33,33
	Sremska Mitrovica	15	11	73,33	4	26,67
Ukupno 2013. god.	7	85	41	48,24	44	51,76
Ukupno	10	303	108	35,64	195	64,36

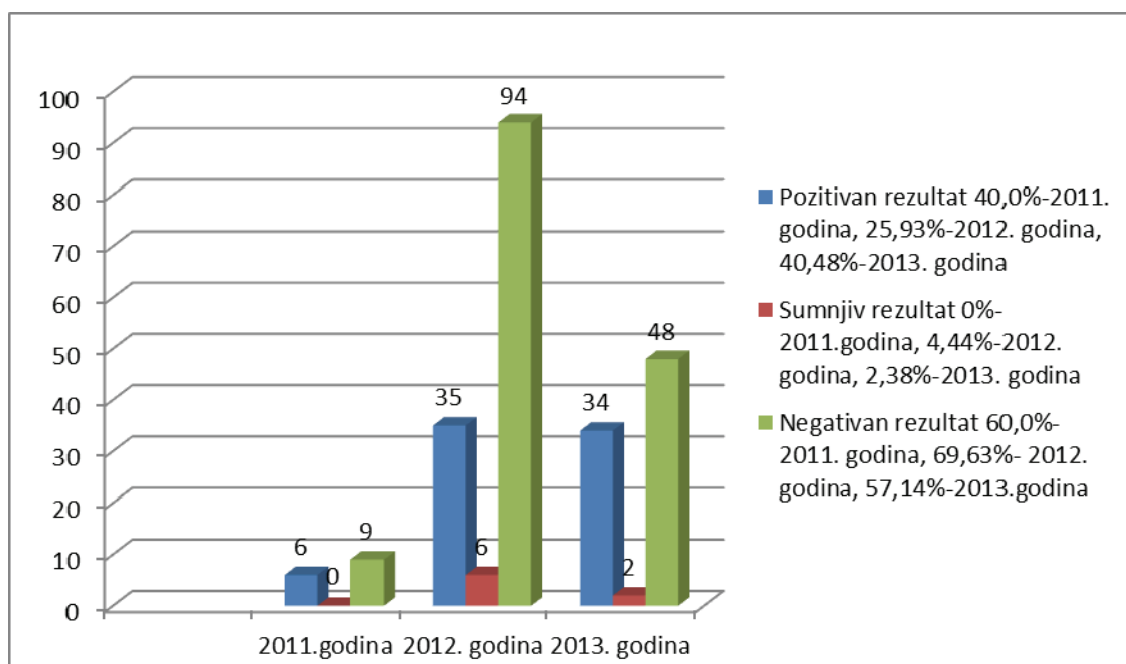
5.3.2.2. Komercijalno dostupan test indirektna imunofluorescencije

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:10 po godini uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog testa indirektna imunofluorescencije (IFA) prikazani su u *Tabeli 25*.

Tabela 25. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:10 dobijeni primenom komercijalno dostupnog testa indirektna imunofluorescencije (IFA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	15	6	40,0	0	0	9	60,0
2012. god.	135	35	25,93	6	4,44	94	69,63
2013. god.	84	34	40,48	2	2,38	48	57,14
Ukupno	234	75	32,05	8	3,42	151	64,53

Na *grafikonu 11*. Prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma konja komercijalno dostupnim testom indirektna imunofluorescencije (IFA) po godini uzorkovanja.



Grafikon 11. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma konja komercijalno dostupnim testom indirektna imunofluorescencije po godini uzorkovanja

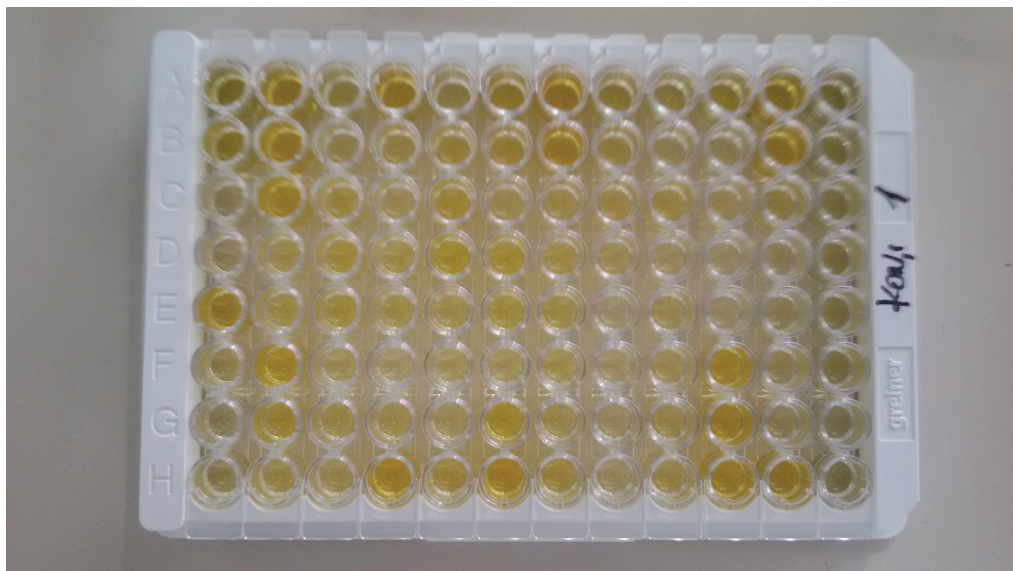
Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:10 dobijeni primenom komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije (IFA) po lokalitetima prikazani su u *Tabeli 26*.

Tabela 26. Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:10 dobijeni primenom komercijalno dostupnog testa indirektno imunofluorescencije (IFA) po lokalitetima

Godina	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma konja	Pozitivno	Procenat pozitivnih uzoraka (%)	Sumnjivo	Procenat sumnjivih (%)	Negativno	Procenat negativnih uzoraka (%)
2011. god.	Požarevac	0	0	0	0	0	0	0
	Beograd	15	6	40,0	0	0	14	60,0
Ukupno 2011. god.	2	15	6	40,0	0	0	14	60,0
2012. god.	Požarevac	10	2	20,0	2	20,0	6	60,0
	Šabac	30	4	13,33	0	0	26	86,67
	Subotica	1	0	0	0	0	1	100
	Beograd	94	29	30,85	4	4,26	61	64,89
Ukupno 2012. god.	4	135	35	25,93	6	4,44	94	69,63
2013. god.	Stara Planina	17	1	5,88	1	5,88	15	88,23
	Pančevo	5	4	80,0	0	0	1	20,0
	Leskovac	12	4	33,33	0	0	8	66,67
	Banatski Karlovac	16	6	37,5	0	0	10	62,5
	Novi Sad	7	3	42,86	1	14,28	3	42,86
	Bačka Topola	12	7	58,33	0	0	5	41,67
	Sremska Mitrovica	15	9	60,0	0	0	6	40,0
Ukupno 2013. god.	7	84	34	40,48	2	2,38	48	57,14
Ukupno	10	234	75	32,05	8	3,42	151	64,53

5.3.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)

5.3.3.1. „In house“ imunoenzimski test (ELISA)



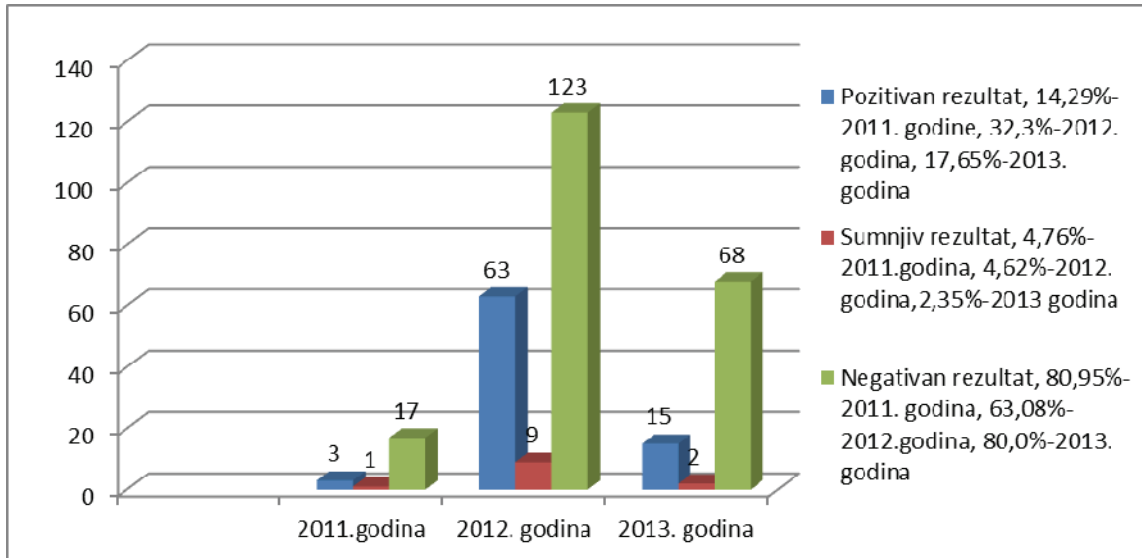
Slika 17. Prikaz reakcije seruma konja primenom „in house“ imunoenzimskog testa

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 po godinama uzorkovanja primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 27*. Na slici 17. nalazi se prikaz reakcije seruma konja primenom „in house“ imunoenzimskog testa.

Tabela 27. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 dobijeni primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv Rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	21	3	14,29	1	4,76	17	80,95
2012. god.	195	63	32,3	9	4,62	123	63,08
2013. god.	85	15	17,65	2	2,35	68	80,0
Ukupno	301	81	26,91	12	3,99	208	69,10

Na *grafikonu 12.* prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma konja „*in house*“ imunoenzimskim testom (ELISA) po godini uzorkovanja.



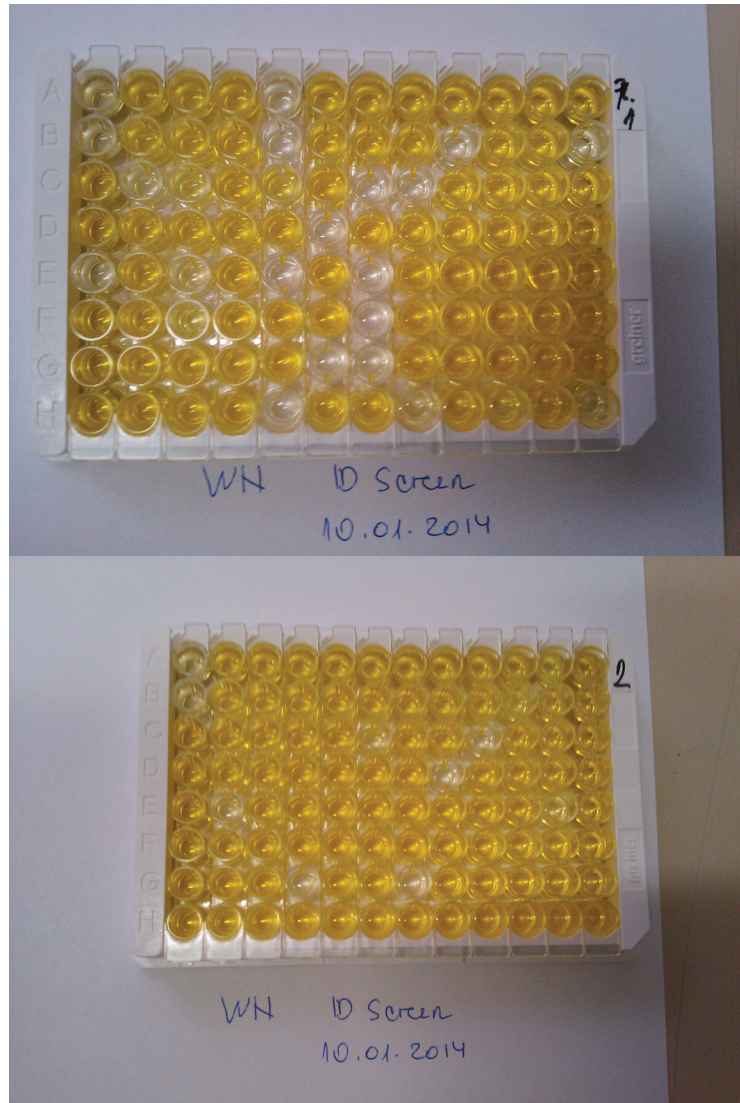
Grafikon 12. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma konja „*in house*“ imunoenzimskim testom (ELISA) po godini uzorkovanja

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* primenom „*in house*“ imunoenzimskog testa (ELISA) po lokalitetima prikazani su u Tabeli 28.

Tabela 28. Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* primenom „*in house*“ imunoenzimskog testa (ELISA) po lokalitetima

Godina	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma konja	Pozitivno	Procenat pozitivnih uzoraka (%)	Sumnjivo	Procenat sumnjivih (%)	Negativno	Procenat negativnih uzoraka (%)
2011. god.	Požarevac	5	1	20,0	1	20,0	3	60,0
	Beograd	16	2	12,5	0	0	14	87,5
Ukupno 2011. god.	2	21	3	14,29	1	4,76	17	80,95
2012. god.	Požarevac	10	2	20,0	1	10,0	7	70,0
	Šabac	30	6	20,0	1	3,33	23	76,67
	Subotica	1	0	0	0	0	1	100
	Beograd	154	55	35,71	7	4,55	92	59,74
Ukupno 2012. god.	4	195	63	32,3	9	4,62	123	63,08
2013. god.	Stara Planina	17	5	29,41	0	0	12	70,59
	Pančevo	5	2	40,0	0	0	3	60,0
	Leskovac	12	1	8,33	1	8,33	10	83,34
	Banatski Karlovac	17	0	0	0	0	17	100
	Novi Sad	7	0	0	0	0	7	100
	Bačka Topola	12	7	58,33	1	8,33	4	33,34
	Sremska Mitrovica	15	0	0	0	0	15	100
Ukupno 2013. god.	7	85	15	17,65	2	2,35	68	80,0
Ukupno	10	301	81	26,91	12	3,99	208	69,10

5.3.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)



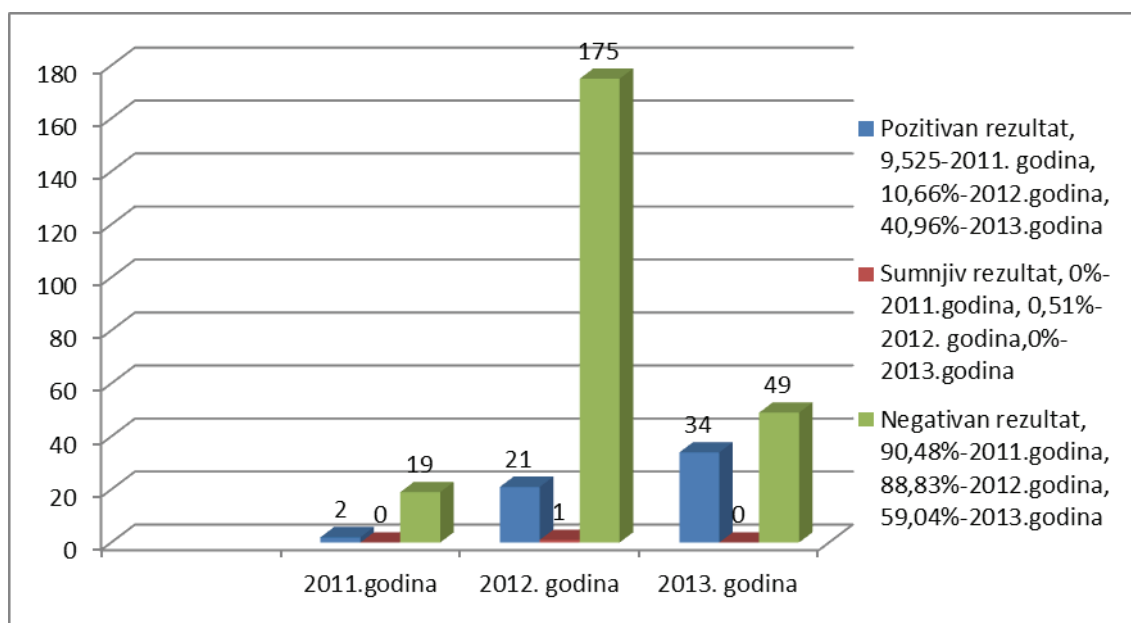
Slika 18. Prikaz završene reakcije komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa sa uzorcima krvnih seruma konja

Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnog anti-prE proteina za *WNV* po godinama uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u Tabeli 29. Na Slici 18 prikazani su rezultati urađenog komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa na uzorcima krvnih seruma konja.

Tabela 29. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnog anti- prE proteina *WNV* dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv Rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	21	2	9,52	0	0	19	90,48
2012. god.	197	21	10,66	1	0,51	175	88,83
2013. god.	83	34	40,96	0	0	49	59,04
Ukupno	301	57	19,94	1	0,33	243	80,73

Na grafikonu 13. prikazani su rezultati pregleda krvnih seruma konja komercijalno dostupnim imunoenzimskim testom (ELISA) po godini uzorkovanja



Grafikon 13. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma konja komercijalno dostupnim imunoenzimskim testom (ELISA) po godini uzorkovanja

U Tabeli 30. prikazani su rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnog anti-prE proteina *WNV* dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) po lokalitetima.

Tabela 30. Rezultati ispitivanja krvnih seruma konja na prisustvo specifičnog anti-prE proteina *WNV* dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) po lokalitetima

Godina	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma konja	Pozitivno	Procenat pozitivnih uzoraka (%)	Sumnjivo	Procenat sumnjivih (%)	Negativno	Procenat negativnih uzoraka (%)
2011. god.	Požarevac	5	0	0	0	0	5	100
	Beograd	16	2	12,5	0	0	14	87,5
Ukupno 2011. god.	2	21	2	9,52	0	0	19	90,48
2012. god.	Požarevac	10	1	10,0	0	0	9	90,0
	Šabac	30	2	6,67	0	0	28	93,33
	Subotica	1	0	0	0	0	1	100
	Beograd	156	18	11,69	1	0,65	137	87,66
Ukupno 2012. god.	4	197	21	10,66	1	0,51	175	88,83
2013. god.	Stara Planina	16	3		0	0	13	
	Pančevo	5	4	80,0	0	0	1	20,0
	Leskovac	12	2	16,67	0	0	10	83,33
	Banatski Karlovac	16	6	37,5	0	0	10	62,5
	Novi Sad	7	3	42,86	0	0	4	57,14
	Bačka Topola	12	5	41,67	0	0	7	58,33
	Sremska Mitrovica	15	11	73,33	0	0	4	26,67
Ukupno 2013. god.	7	83	34	40,96	0	0	49	59,04
Ukupno	10	301	57	19,94	1	0,33	243	80,73

U tabeli 31 prikazani su zbirni rezultati prisustva *WNV* antitela u krvnim serumima konja tokom godina ispitivanja primenom 5 dijagnostičkih testova

Tabela 31. Zbirni rezultati prisustva *WNV* antitela u krvnim serumima konja tokom godina ispitivanja

Godina uzorkovanja krvnih seruma konja	Uzorkovano seruma	AGID	IFA „in house“	IFA komercijalna	ELISA „in house“	ELISA komercijalna
2011.	21	0/21 (0%)	4/21 (19,05%)	6/15 (40,0%)	3/21 (14,29%)	2/21 (9,52%)
2012.	197	17/197 (8,63%)	63/197 (31,98%)	35/135 (25,93%)	63/195 (32,3%)	21/197 (10,66%)
2013.	85	0	41/85 (48,24%)	34/84 (40,48%)	15/85 (17,5%)	34/83 (40,96%)
Ukupno	303	17/303 (5,61%)	108/303 (35,64%)	75/234 (32,05%)	81/301 (26,91%)	57/301 (19,94%)

5.3.4. Uporedni rezultati dijagnostičkih testova na krvnim serumima konja

Uporedni rezultati dijagnostičkih testova dobijeni ispitivanjima na krvnim serumima konja (agar gel imunodifuzioni test, „in house“ test indirektne imunofluorescencije, komercijano dostupan test indirektne imunofluorescencije, „in house“ imunoenzimski test (IgG), komercijalno dostupan imunoenzimski test (anti prE protein *WNV*)) dati su u PRILOGU 2.

5.3.5. Statistička analiza rezultata

Utvrđivanje statističke značajnosti dijagnostičkih testova rađeno je McNemar-ovom metodom.

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ testa indirektno imunofluorescencije (IFA) sa komercijalno dostupnim testom indirektno imunofluorescencije (IFA) su pokazali da između dva testa izvedenih sa krvnim serumima konja ne postoji statistički značajna razlika ($p < 0.383$), što je prikazano na izvodima ispod:

IFA in house * IFA komercijalna Crosstabulation				
Count		IFAkomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
IFAIHouse	negativan	138	8	146
	pozitivan	13	67	80
Total		151	75	226

Test Statistics ^a	
	IFAIHouse & IFAkomercijalna
N	226
Exact Sig. (2-tailed)	.383 ^b

a. McNemar Test
b. Binomial distribution used.

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ imunoenzimskog IgG testa (ELISA) sa komercijalno dostupnim imunoenzimskim anti PrE testom (ELISA) su pokazali da između dva testa rađena na krvnim serumima konja ne postoji statistički značajna razlika ($p=0.022$), što je prikazano na izvodima ispod:

ELISA in house * ELISA komercijalna Crosstabulation				
Count		ELISAkomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
ELISAIHouse	negativan	164	42	206
	pozitivan	67	14	81
Total		231	56	287

Test Statistics ^a	
	ELISAIHouse & ELISAkomercijalna
N	287
Chi-Square ^b	5.284
Asymp. Sig.	.022

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

Poređenjem dijagnostičke vrednosti agar gel imunodifuzionog testa (AGID) sa imunoenzimskim testom (ELISA) i testom indirektno imunofluorescencije (IFA) kako „in house“ tako i komercijalno dostupnog pokazalo je da postoje statistički značajne razlike između AGID i „in house“ ELISA i IFA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG i IFA testa ($p < 0.001$), što je prikazano ispod:

AGID i IFA

Count		IFAIHouse		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	195	91	286
	pozitivan	0	17	17
Total		195	108	303

Count		IFAkomecijalna		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	151	62	213
	pozitivan	0	13	13
Total		151	75	226

	AGID & IFAInHouse	AGID & IFAkomercijalna
N	303	226
Chi-Square ^b	89.011	60.016
Asymp. Sig.	.000	.000

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

AGID i ELISA

Count		ELISAIHouse		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	208	64	272
	pozitivan	0	17	17
Total		208	81	289

Count		ELISAkomecijalna		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	229	54	283
	pozitivan	14	3	17
Total		243	57	300

	AGID & ELISAIHouse	AGID & ELISAkomecijalna
N	289	300
Chi-Square ^b	62.016	22.368
Asymp. Sig.	.000	.000

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

5.3.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al.,2000

Upoređivanjem rezultata dijagnostičkih testova preko metoda opisanih u radu Enoe et al., 2000 na uzorcima seruma konja uzorkovanih tokom 2012. i 2013. godine dobijeni su sledeći rezultati:

„*In house*“ test indirektne imunofluorescencije u poređenju sa komercijlno dostupnim testom: Osetljivost 94%; Specifičnost 90%.

„*In house*“ imunoenzimski test u poređenju sa komercijlno dostupnim testom: Osetljivost 26%; Specifičnost 70%.

Agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ testom indirektne imunofluorescencije: Osetljivost 0%; Specifičnost 100%.

Agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ imunoenzimskim testom: Osetljivost 48%; Specifičnost 100%.

5.4. KRVNI SERUMI PASA

Uzorci krvnih seruma pasa uzorkovani su u periodu od 2011.-2013. godine na 10 izabраниh lokaliteta na teritoriji Republike Srbije (*Tabela 32*).

Tabela 32. Lokaliteti i broj uzoraka krvnih seruma pasa po godini uzorkovanja

	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	Procenat (%) od ukupnog broja uzorkovanih krvnih seruma pasa
2011. godina	Beograd	18	
	Ub	12	
Ukupno 2011. god.	2	30	16,3
2012. godina	Beograd	6	
	Bujanovac	20	
	Loznica	20	
	Požarevac	8	
	Vršac	20	
Ukupno 2012. god.	5	74	40,22
2013. godina	Sremska Mitrovica	20	
	Leskovac	20	
	Šabac	20	
	Pančevo	20	
Ukupno 2013. god.	4	80	
Ukupno	10	184	43,48

5.4.1. Agar gel imunodifuzioni test (AGID)

Metodom agar gel imunodifuzije (AGID) pregledano je ukupno 184 seruma, a pozitivni rezultati nisu zabeleženi.

5.4.2. Metoda indirektne imunofluorescencije (IFA)

5.4.2.1. „*In house*“ test indirektne imunofluorescencije

Primena „*in house*“ testa indirektne imunofluorescencije nije bila moguća, jer po izvođenju reakcije uz dobre rezultate kontrolnih seruma nije mogla da se ustanovi specifična imunofluorescentna reakcija seruma pasa (dobijena je slika difuzne imunofluorescencije koja obuhvata kako inficirane ćelije tako i međucelijski prostor) najverovatnije usled karakteristika samih seruma pasa.

5.4.2.2. Komercijalno dostupan test indirektne imunofluorescencije

Primena komercijalnog testa indirektne imunofluorescencije nije bila moguća, jer po izvođenju reakcije uz dobre rezultate kontrolnih seruma i praćenje instrukcija tehničke službe proizvođača (inaktivacija seruma u vodenom kupatilu na +56 °C u trajanju od 30 minuta i upotreba već pripremljenih FITC obeleženih antitela od strane proizvođača nije mogla da se ustanovi specifična imunofluorescentna reakcija krvnih seruma pasa (dobijena je slika difuzne imunofluorescencije koja obuhvata kako inficirane ćelije tako i međucelijski prostor).

5.4.3. Imunoenzimska metoda (ELISA)

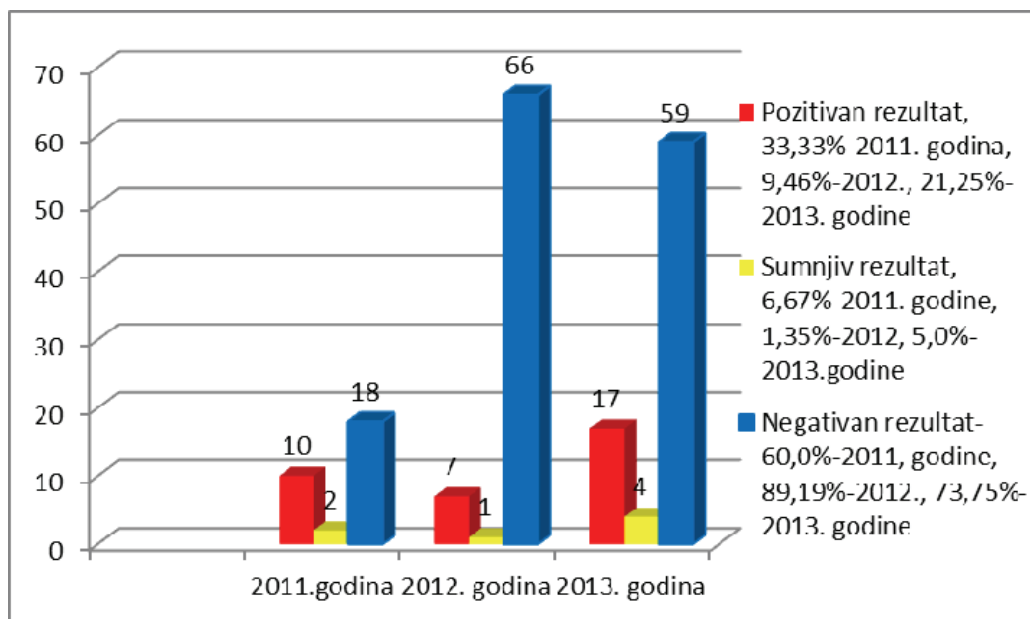
5.4.3.1. „In house“ imunoenzimski test (ELISA)

Rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 po godinama uzorkovanja primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 33*.

Tabela 33. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa na prisustvo specifičnih IgG antitela za *WNV* u razređenju 1:100 dobijeni primenom „in house“ imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv Rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	30	10	33,33	2	6,67	18	60,0
2012. god.	74	7	9,46	1	1,35	66	89,19
2013. god.	80	17	21,25	4	5,0	59	73,75
Ukupno	184	34	18,48	7	3,8	143	77,72

Na *grafikonu 14*. Prikazani su rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa „in house“ imunoenzimskom metodom (ELISA) po godini.



Grafikon 14. Rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa „in house“ imunoenzimskom metodom (ELISA) po godini

U tabeli 34. je dat prikaz rezultata pregleda krvnih seruma pasa „in house“ imunoenzimskim testom prema lokalitetu uzorkovanja.

Tabela 34. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma pasa prema mestu uzorkovanja

Lokalitet uzorkovanja seruma pasa	Broj pregledanih uzoraka	Broj pozitivnih pasa	Procenat pozitivnih pasa (%)	Broj sumnjivih pasa	Procenat sumnjivih pasa (%)	Broj negativnih pasa	Procenat negativnih pasa (%)
Beograd	24	7	29,16	1	4,17	16	66,67
Ub	12	3	25,0	1	8,33	8	66,67
Bujanovac	20	1	5,0	0	0	19	95,0
Loznica	20	4	20,0	0	0	16	80,0
Požarevac	8	0	0	1	12,5	7	87,5
Vršac	20	2	10,0	0	0	18	90,0
Sremska	20	3	25,0	0	0	17	85,0
Leskovac	20	6	30,0	0	0	14	70,0
Šabac	20	4	80,0	2	10,0	14	70,0
Pančevo	20	4	80,0	2	10,0	14	70,0
Ukupno	184	34	18,48	7	3,8	143	77,72

5.4.3.2. Komercijalno dostupan imunoenzimski test (ELISA)



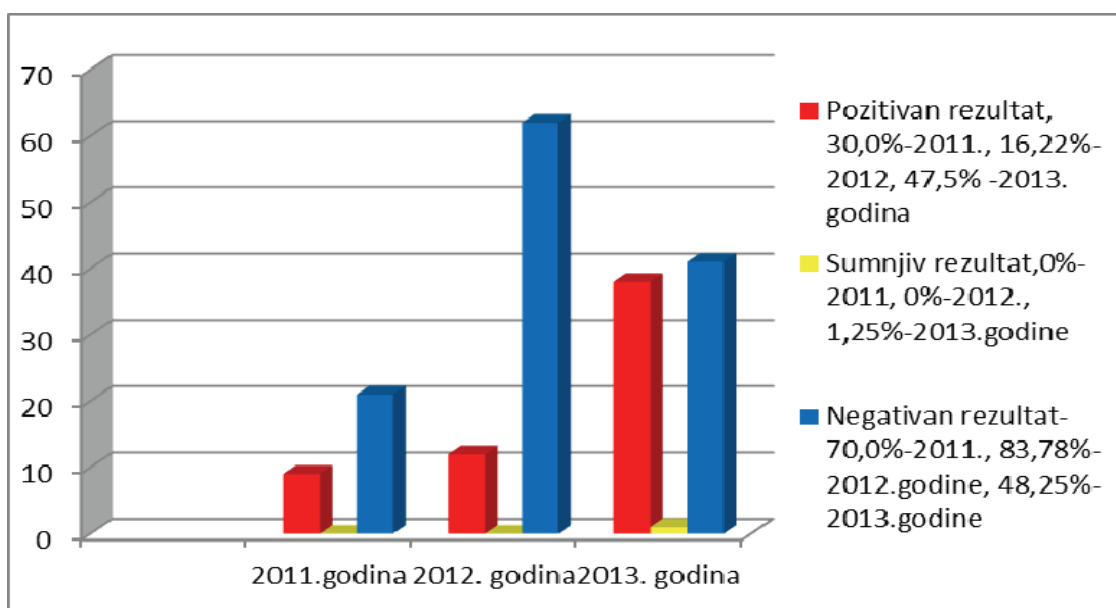
Slika 19. Prikaz rezultata komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa na uzorcima seruma pasa.

Rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa na prisustvo specifičnog anti-prE proteina za *WNV* po godinama uzorkovanja primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA) prikazani su u *Tabeli 35*. Na *slici 19* prikazan je rezultat komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa na uzorcima seruma pasa.

Tabela 35. Zbirni rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa na prisustvo specifičnog anti- prE proteina WNV dobijeni primenom komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (ELISA)

Godina uzorkovanja	Broj pregledanih uzoraka po godini	Pozitivan rezultat	Procenat pozitivnih rezultata (%)	Sumnjiv rezultat	Procenat sumnjivih rezultata (%)	Negativan rezultat	Procenat negativnih rezultata (%)
2011. god.	30	9	30,0	0	0	21	70,0
2012. god.	74	12	16,22	0	0	62	83,78
2013. god.	80	38	47,5	1	1,25	41	48,25
Ukupno	184	59	32,07	1	0,54	124	67,39

Na *grafikonu 15* prikazani su rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa komercijalno dostupnim imunoenzimskim testom (ELISA) po godini.



Grafikon 15. Rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa komercijalno dostupnim imunoenzimskim testom (ELISA) po godini

U tabeli 36 je dat prikaz rezultata pregleda krvnih seruma pasa komercijalnim imunoenzimskim testom prema lokalitetu uzorkovanja.

Tabela 36. Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma pasa komercijalnim imunoenzimskim testom prema lokalitetu uzorkovanja

Lokalitet uzorkovanja seruma pasa	Broj pregledanih uzoraka	Broj pozitivnih pasa	Procenat pozitivnih pasa(%)	Broj sumnjivih pasa	Procenat sumnjivih pasa(%)	Broj negativnih pasa	Procenat negativnih pasa(%)
Beograd	24	10	41,66	0	0	14	58,34
Ub	12	1	8,33	0	0	11	91,67
Bujanovac	20	1	5,0	0	0	19	95,0
Loznica	20	4	20,0	0	0	16	80,0
Požarevac	8	1	12,5	0	0	7	87,5
Vršac	20	4	20,0	0	0	16	80,0
Sremska Mitrovica	20	14	70,0	0	0	6	30,0
Leskovac	20	2	10,0	1	5,0	17	85,0
Šabac	20	6	30,0	0	0	12	70,0
Pančevo	20	16	80,0	0	0	4	20,0
Ukupno	184	59	32,07	1	0,54	124	67,39

U tabeli 37 dati su zbirni rezultati serološke dijagnostike prisustva antitela u serumima pasa tokom godina ispitivanja primenom 5 dijagnostičkih testova.

Tabela 37. Zbirni rezultati prisustva *WNV* antitela u krvnim serumima pasa tokom godina ispitivanja primenom 5 dijagnostičkih testova

Godina uzorkovanja krvnih seruma konja	Uzorkovano seruma	AGID	IFA „in house“	IFA komercijalna	ELISA „in house“	ELISA komercijalna
2011.	30	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	10/30 (33,33%)	9/30 (30,0%)
2012.	74	0/74 (0%)	0/74 (0%)	0/74 (0%)	7/74 (9,46%)	12/74 (16,22%)
2013.	80	0/80 (0%)	0/80 (0%)	0/80 (0%)	17/80 (21,25%)	38/80 (47,5%)
Ukupno	184	0/184 (0%)	0/184 (0%)	0/184 (0%)	34/184 (18,47%)	59/184 (30,05%)

5.4.4. Uporedni rezultati dijagnostičkih testova na krvnim serumima pasa

Uporedni rezultati dijagnostičkih testova sprovedenih sa krvnim serumima pasa (agar gel imunodifuzioni test, „in house“ test indirektne imunofluorescencije, komercijano dostupan test indirektne imunofluorescencije, „in house“ imunoenzimski test (IgG), komercijalno dostupan imunoenzimski test (anti prE protein *WNV*) dati su u PRILOGU 3.

5.4.5. Statistička analiza rezultata

Utvrđivanje statističke značajnosti dijagnostičkih testova rađeno je McNemar-ovom metodom.

Rezultati utvrđivanja statističke značajnosti „in house“ imunoenzimskog IgG testa (ELISA) sa komercijalno dostupnim imunoenzimskim anti PrE testom (ELISA) su pokazali da između dva testa rađena sprovedenih sa krvnim serumima pasa postoji statistički značajna razlika ($p < 0.01$), što je prikazano na izvodima ispod:

Count		ElisaKomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
ELISAinHouse	negativan	106	37	143
	pozitivan	15	18	33
Total		121	55	176

	ELISAinHouse & ElisaKomercijalna	AGID & ELISAinHouse	AGID & ElisaKomercijalna
N	176	177	183
Chi-Square ^b	8.481	32.029	57.017
Asymp. Sig.	.004	.000	.000

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

Poređenjem dijagnostičke vrednosti agar gel imunodifuzionog testa (AGID) sa imunoenzimskim testom (ELISA) kako „in house“ tako i komercijalno dostupnog, pokazalo je da postoje statistički značajne razlike između AGID i „in house“ ELISA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG testa ($p < 0.001$), što je prikazno ispod:

Count		ELISAinHouse		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	143	34	177
	pozitivan	15	18	33
Total		143	34	177

Count		ElisaKomercijalna		Total
		negativan	pozitivan	
AGID	negativan	124	59	183
	pozitivan	15	18	33
Total		124	59	183

	ELISAinHouse & ElisaKomercijalna	AGID & ELISAinHouse	AGID & ElisaKomercijalna
N	176	177	183
Chi-Square ^b	8.481	32.029	57.017
Asymp. Sig.	.004	.000	.000

a. McNemar Test
b. Continuity Corrected

5.4.6. Određivanje osetljivosti i specifičnosti testova preko metoda Enoe et al.,2000

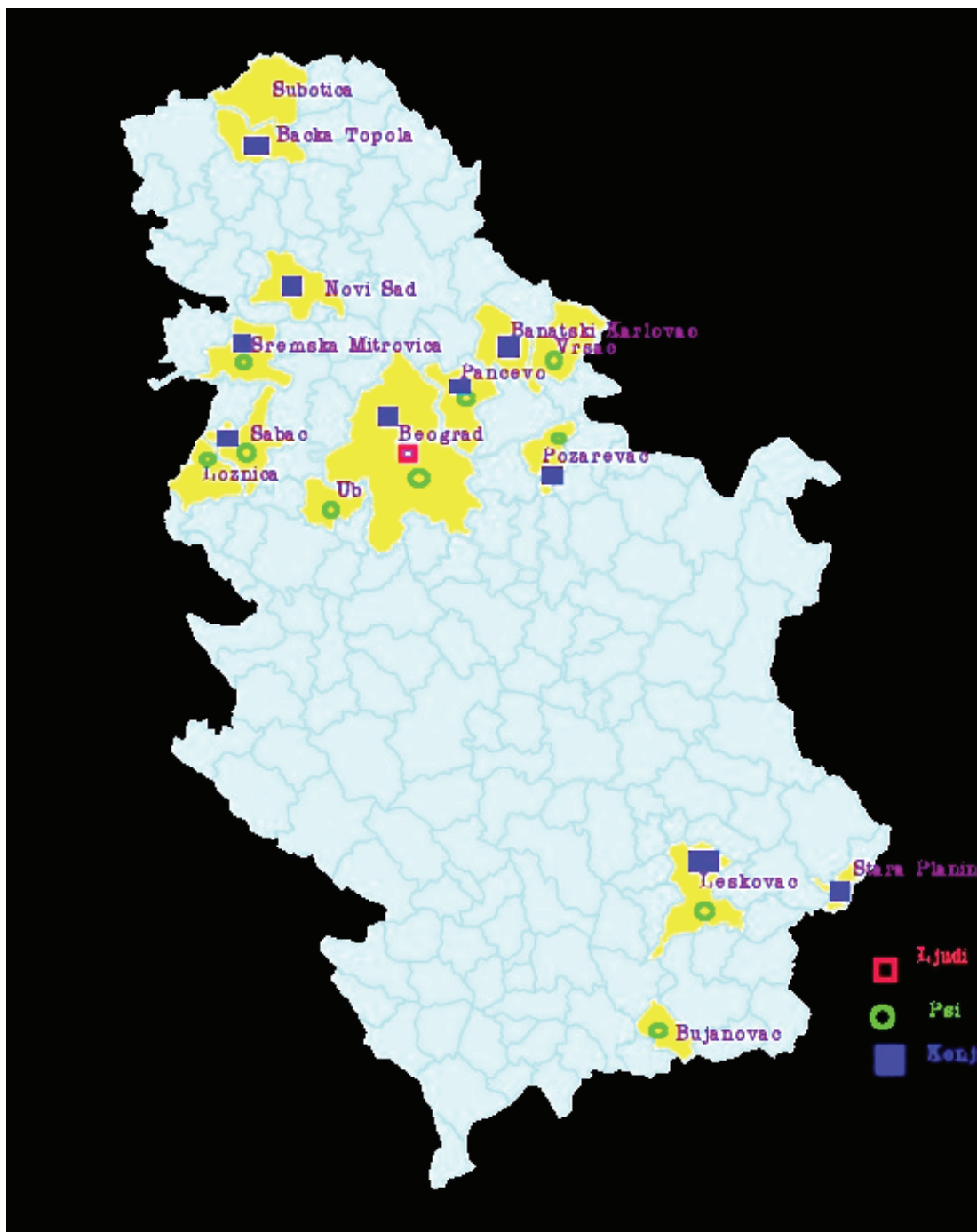
Upoređivanjem rezultata dijagnostičkih testova preko metoda opisanih u Enoe et al., 2000 na uzorcima seruma pasa uzorkovanih tokom 2011., 2012. i 2013. godine dobijeni su sledeći rezultati:

„*In house*“ imunoenzimski test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom:

Osetljivost 0%; Specifičnost 87,5%.

5.5. GEOGRAFSKO MAPIRANJE

Na *mapi 1* su prikazane teritorije-regioni gradova u kojima su vršena istraživanja i prikaz geografske distribucije seropozitivnih nalaza (prevalence) ispitivanih životinja i ljudi.



Mapa 1. Ispitivani lokaliteti- regioni R. Srbije i geografska distribucija seropozitivnih nalaza ispitivanih životinja i ljudi

6. DISKUSIJA

Virus groznice Zapadnog Nila (*WNV*) je samo jedan u grupi od preko 550 virusa koje prenose insekti i koji su registrovani u međunarodnom katalogu (www.ictvonline.org). Sa malim izuzetkom to su uglavnom *RNK* virusi. Većina ovih virusa izazivaju bolesti zoonoznog karaktera. Na ljude i životinje prenose se hematofagnim artropodama: krpeljima, komarcima i flebotominama. Primarno su neurotropni, a letalitet posle infekcije zavisi od virusa i kreće se od 5-80%. Neki od ovih virusa zbog svojih biohazardnih karakteristika nalaze se na listama bioloških agenasa uperenih protiv ljudi, životinja i biljaka. Zbog načina prenošenja, epidemije i epizootije su masovne, sa ogromnim ekonomskim gubicima, a dešavaju se najčešće u letnjim mesecima, kada su klimatski uslovi najpogodniji za razvoj i održavanje vektorskih vrsta. Zbog načina prenošenja i održavanja ovih virusa, infekcije koje uzrokuju u prirodi čine grupu prirodno žarišnih virusnih bolesti. Čovek u potrazi za hranom, rekreacijom i izvorima energije dolazi u kontakt sa prirodnim žarištem, narušava njegovu ekološku ravnotežu i aktivira ga sa teškim posledicama. Intenzitet epizootijskog i epidemijskog procesa u prirodnom žarištu zavisi od brojnosti svake populacije uključene u lanac infekcije (uzročnik, prirodni domaćin, vektor). Čovek je u ovom lancu slučajni domaćin i ekološki predstavlja „slepu ulicu“.

Virus groznice Zapadnog Nila izolovan je 1937. godine iz krvi obolele osobe u Centralnoj Africi da bi uskoro postao globalni problem. Prve velike epidemije van Afričkog kontinenta zabeležene su u Izraelu 1953. i 1957. godine, kada je uočeno da su najviše obolevala deca, a da su teške neuroinvazivne forme zavisile od starosti obolelih (Bernkopf et al., 1953; Chowers et al., 2001), što je uočeno i kod bolesnika u R.Srbiji u epidemijama 2012. i 2013. godine (Popović et al., 2013).

Izolacijom i karakterizacijom *WNV* stvorile su se mogućnosti za sveobuhvatnija seroepidemiološka i seroepizootiološka istraživanja. Tako je prvi put u Evropi 1959. godine opisano prisustvo antitela za *WNV* kod obolelih iz Albanije (Bardos et al., 1959), da bi 1962. godine bilo dokazano njegovo prisustvo na jugu Francuske, kada je pored obolevanja ljudi registrovano i 80 obolelih konja sa neurološkim smetnjama i letalnim ishodom od 30% (Panthier et al., 1968; Joubert et al., 1970). Prvi evropski izolati *WNV* su izolovani 1963. godine, a poticali su iz komaraca i obolelih ljudi u delti

reke Rone (Murgue et al., 2001) i iz ljudi i krpelja u delti reke Volge (Chumakov et al., 1964).

Zbog pojava epidemija *WNV* u Mediteranu (Alžir 1994. godina, Maroko 1996. godina, Tunis, 1997. godina, Izrael 1988. godina i 2000. godine) i u okruženju (Rumunija 1996. godine, Italija 1998. godine, Rusija 1999. godine, Francuska 2000. godine), kao i pojave *WNV* po prvi put u SAD-u (1999. godine) (Murgue et al., 2001; Lanciotti et al., 1999), i u Republici Srbiji se počinju aktivirati istraživanja ove opasne zoonoze. U svim prethodno pomenutim epidemijama uzročnik je bio *WNV* linije 1 karakterističan za epidemije Severne Afrike, a koji je najverovatnije prenešen u Evropu migratornim pticama (imaju identičnu sekvencu sa virusom detektovanim u Keniji i Senegalu), a koje su istovremeno sa hematofagnim vektorima i rezervoari virusa u prirodi (Savage et al., 1999). U 2004. godini je prvi put u Evropi (Mađarskoj) registrovana i pojava *WNV* linije 2 (*WNV* koji je do tada bio endemski za Madagaskar i Južnu Afriku) kroz prvi dokumentovani slučaj neuroinvazivne bolesti kod uginulog jastreba (Erdely et al., 2007, Bakonyi et al., 2006).

U Republici Srbiji, prvi podaci o prisustvu specifičnih antitela kod ljudi za *WNV* datiraju iz 1972 . godine, kada su Bordoški i sar. objavili da su metodom inhibicije hemaglutinacije na sedam lokaliteta registrovali prisustvo antitela u humanoj populaciji koja su se kretala od 0% (u regionu Sandaka i Novog pazara) do 19.4% u regionu Zapadne Srbije (Užice) (Bordoški et al., 1972). Danas, Republika Srbija geografskom pozicijom pripada umerenom klimatskom pojasu sa tendencijom pomeranja klimatskih zona i mogućnosti pojave vektora i tropskih bolesti koje nisu registrovane na njenoj teritoriji. Pojava i verovatni prenos *WNV* putem migracionih ptica uz postojanje vektora prenosilaca učinila je da linija 2 *WNV* od 2004. godine utvrđena na teritoriji Evrope postane endemska i na teritoriji Srbije. Zbog ovako nepovoljne epizootiološke i epidemiološke situacije u Evropi i svetu sa *WNV* infekcijama u R.Srbiji 2010. godine, a pre pojave prve zabeležene epidemije, započinju obimna ciljana epizootiološka istraživanja *WNV* odabirom ciljanih lokaliteta, vrsta prijemčivih životinja i ljudi i seroloških metoda. Postoje oskudni podaci o seroprevalenciji kod različitih životinjskih vrsta u Republici Srbiji. Objavljeni podaci se uglavnom odnose na konje, kao viskovrednu životinjsku vrstu koja oboleva sa izraženom kliničkom slikom (Đuričić et al., 2013, Lupulović et al., 2011, Medić et al., 2014). Đuričić i sar. objavili su rezultate

dobijene primenom AGID testa kod pasa kada je ustanovljeno 0.93% pozitivnih od 1076 uzoraka krvnih seruma pasa nepoznatih vlasnika, 0.31% pozitivnosti u serumima 318 domaće živine, dok antitela za *WNV* nisu ustanovljena kod magaraca, ovaca, koza i srdaća. Escribano-Romero i sar. prikazuju rezultate seroprevalencije u populaciji svinja, divljih svinja i srdaća kada je otkriveno 15,4% pozitivnih uzoraka svinja, 17,6% pozitivnih divljih svinja i 18,7% pozitivnih srdaća (Escribano-Romero et al.,2015). U Republici Srbiji postoji podatak o izolaciji *WNV* RNK iz divljih ptica (Petrović et al., 2012) dok nema podataka o dokazanoj kliničkoj infekciji drugih životinjskih vrsta. Prva epidemija *WNV* u Republici Srbiji zabeležena je 2012. godine (Popović et al., 2013). Epidemiološko-epizootiološka situacija u Republici Srbiji od pojave epidemije *WNV* 2012. godine je nepovoljna. Svake godine od tada je registrovana pojava epidemije sa brojem obolelih ljudi koji je među najvišim u Evropi (ecdc.europa.eu). Paralelno sa pojavom epidemija kod ljudi od 2012. godine iz literaturnih podataka može se reći da poslednjih godina postoji povećanje seroprevalencije za *WNV* u populaciji ljudi i životinja što potvrđuju i ovde prikazani rezultati u tabelama 18, 31 i 37.

Širenje *WNV* i stalno prisustvo obolelih ljudi i životinja nametnulo je potrebu za brzom, pravovremenom i ekonomski pristupačnom laboratorijskom dijagnostikom. Ubrzo po izbijanju epidemije u SAD 1999. godine došlo je do brzog razvoja dijagnostičkih testova. Veliki broj laboratorija je uveo „*in house*“ dijagnostičke testove zajedno sa primenom komercijalnih testova u svakodnevnoj dijagnostici kako prisustva antigena tako i antitela, pri čemu nisu uočene značajne razlike u vrednosti rezultata između ovih testova (Niedrig et al., 2007, Sanchini et al.,2013), što se pokazalo i kroz rezultate ove disertacije. Kada se razmatra osetljivost i specifičnost seroloških dijagnostičkih testova treba napomenuti da oni zavise od samih uzoraka i vrste upotrebljenog testa. Virus Zapadnog Nila kao flavivirus pokazuje visok stepen unakrsne reaktivnosti sa drugim prisutnim flavivirusima (krpeljski encefalitis, Japanski encefalitis, virus žute groznice, denga virusi i Usutu virus) kada se koriste metode IFA i ELISA (ECDC, 2011). Ova činjenica umnogome komplikuje dobijanje tačnog rezultata primenom samo jednog dijagnostičkog testa, te su potvrdni testovi neophodni zajedno sa pratećim podacima o kliničkoj slici ispoljenoj kod pacijenata, anamnestičkim podacima i istorijom bolesti, vrstom uzorka dostavljenim na pregled i dr. Prilikom izbora adekvatnog laboratorijskog testa treba imati u vidu i podatak iz literature gde se

navodi da je mogućnost detekcije *WNV* linije 1 bila veća u odnosu na skorije prisutnu liniju 2, te da linija virusa koji je prouzrokovao infekciju ima uticaja na preciznost laboratorijske dijagnostike (ECDC,2011). Prilikom serološke dijagnostike više laboratorija je uspešno detektovalo prisustvo IgG *WNV* specifičnih antitela nego IgM (ECDC,2011). Ovo se može tumačiti vremenom uzorkovanja i dinamikom nastanka antitela posle infekcije sa *WNV* prilikom koje se navodi da je prosečno vreme serokonverzije između detekcije *WNV* RNK 3.9 dana, a do pojave IgG 7.7 dana (Busch et al., 2008) odnosno prema studiji Roehrig i sar. imunoglobulini klase M (IgM) se mogu naći u krvnom serumu već oko osmog dana po infekciji sa *WNV*. Ova se antitela zadržavaju oko dva meseca u krvotoku, a u pojedinim slučajevima mogu da se dokažu i 500 dana posle infekcije. Imunoglobulini klase G se pojavljuju kasnije od IgM antitela, a najveću koncentraciju dostižu oko treće i četvrte nedelje po infekciji, a često i ranije. Ova antitela mogu da se utvrde u krvnom serumu i posle 500 dana od infekcije (Roehrig et al., 2003). Dinamika razvoja specifičnih antitela za *WNV* ima uticaja prilikom tumačenja dobijenih rezultata seroloških testova.

Uzorci poreklom od ljudi

Analizom ispitivanja uzoraka poreklom od ljudi primenom 3 metode i 7 laboratorijskih testova utvrđeni su očekivano visoke seroprevalence s'obzirom da se radi u krvnim serumima ljudi koji su, sa suspektnim kliničkim simptomima uzorkovani tokom epidemije *WNV* 2012. i 2013. godine (Tabela 18).

Metodom AGID ustanovljena je seropozitivnost kod 9,76% uzoraka tokom 2012. godine i 16,22% uzoraka tokom 2013. godine kada je pregledano 111 uzoraka seruma ljudi. Napominjemo da su postojale sumnjive reakcije u određenom serumu koji su drugim metodama pokazali pozitivan nalaz pregleda, ali ovi rezultati nisu uzimani u obzir prilikom određivanja seropozitivnosti (tabela 9). Odsustvo visokog procenta pozitivnih nalaza testom AGID se može pripisati vremenu uzorkovanja seruma u odnosu na nastanak infekcije, pošto se precipitinska antitela najranije mogu otkriti posle 3 nedelje od početka infekcije, a održavaju se do 4 meseca od momenta infekcije. Ovo nismo mogli da potvrdimo nalazima u savremenoj literaturi u vezi istraživanja na *WNV*, već smo dozvolili tumačenje na osnovu istraživanja sa nekim drugim virusima (Gligić, 1979). U ukupno 9 ispitivanih uzoraka krvnih seruma ljudi uzorkovanih tokom 2013.

godine zabeležena je pojava reakcije ispitivanog seruma sa negativnim (2 krvna seruma) i pozitivnim (5 krvnih seruma) kontrolnim serumom napravljenim imunizacijom miševa, te pojava zone inhibicije reakcije u okolini seruma u 2 slučaja ispitivanih seruma, što je prikazano u *Tabli 10*. Ovo ukazuje na dodatne faktore koji utiču na serološku dijagnostiku, kao što su moguće prisustvo antigena *WNV* i drugih flavivirusa u serumima koji reaguju sa pozitivnim kontrolnim serumom (ECDC, 2011), prisustvo antitela na ćelije domaćina (miša) od kojih su pravljeni specifični imuni serumi u slučaju reakcija sa negativnim serumom, kao i nespecifičnim faktorima vezanim za vrstu ili jedinku kako će se u daljem tekstu pokazati kod dijagnostike pasa.

Statističkim poređenjem dijagnostičke vrednosti agar gel imunodifuzionog testa (AGID) sa imunoenzimskim testom (ELISA) i testom indirektno imunofluorescencije (IFA) kako „*in house*“ tako i komercijalno dostupnog pokazalo je da ne postoje statistički značajne razlike samo između AGID i „*in house*“ ELISA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG testa, dok su postojale statistički značajne razlike sa „*in house*“ IFA i komercijalnim IFA testom, što je razumljivo jer je IFA metod u našim rezultatima i u podacima u literaturi (Sanchini et al., 2013) metod veće osetljivosti i specifičnosti u odnosu na ELISA metod.

Rezultati pregleda seruma primenom IFA metode pokazali su visoku podudarnost rezultata uz odsustvo statistički značajne razlike između „*in house*“ i komercijalnog dijagnostikuma što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Niedrig et al., 2007. Ovo govori u prilog da je metod IFA adekvatniji (osetljiviji i specifičniji) za serološku dijagnostiku *WNV* od ELISA metode, što je potvrđeno i u rezultatima Sanchini et al., 2013. gde je IFA imala i veću specifičnost i osetljivost u odnosu na ELISA metod. U tabeli 12. i grafikonu 3 prikazani su rezultati titracije *WNV* pozitivnih seruma „*in house*“ IFA testom. Uočava se da je najveći broj pozitivnih uzoraka imao visoke titre antitela, pri čemu je uočljivo povećanje u 2013. godini u vrednostima titra od 1:1024 i 1:2048 što ukazuje na intenzitet i učestalost delovanja virusa u drugoj godini epidemije.

Serumi ljudi, kao i uzorci likvora kod pacijenata koji su iz istorije bolesti imali indikacije za skori nastanak *WNV* infekcije su pregledani komercijalnim ELISA IgM testom, paralelno sa ispitivanjem prisustva IgG antitela. Ovi rezultati pokazuju da je većina pacijenata koji su imali IgM pozitivan nalaz u likvoru imalo i seropozitivnost IgM u serumu, što ukazuje na skorašnju infekciju *WNV* i razvoj kliničke slike (Prilog 1).

Primenom „in house“ IgG ELISA testa dobijena je seropozitivnost od 19,51% ispitanih uzoraka tokom 2012. godine i 10,71% ispitanih uzoraka tokom 2013. godine, što je niže od vrednosti dobijenih primenom komercijalnog kita (53,85% tokom 2012. godine i 97,3% tokom 2013. godine). Razlika u dobijenim vrednostima između komercijalnog i „in house“ ELISA IgG testa je rezultat više granične vrednosti koju smo definisali za „in house“ ELISA IgG test, te podižući specifičnost „in house“ testa izgubili smo na visini osetljivosti testa. Razlika u prevelenci nalaza IgG antitela za *WNV* testiranih uzoraka iz različitih godina (veći broj uzoraka sa postavljenom sumnjom na infekciju sa *WNV* tokom 2013. godine) može se objasniti činjenicom i kriterijumom odabira pacijenata pošto su zbog već postojeće objave epidemije pacijenti dolazili u ranoj fazi infekcije te je zastupljenost IgG antitela nešto niža. Najčešće nisu postojale mogućnosti za uzorkovanje parnih seruma u kojima bi se registrovao porast zastupljenosti IgG antitela kako zbog progresivnog toka bolesti kod pojedinih pacijenata tako zbog nemogućnosti praćenja stanja posle prestanka hospitalizacije. Statističkom obradom podataka nije utvrđena statistički značajna razlika između komercijalnog IgG ELISA testa i „in house“ IgG ELISA testa.

Zbirni rezultati ispitivanja prikazani u tabeli 18. pokazuju da su u epidemijskoj 2012. godini AGID testom antitela nađena kod 4 od 41 testiranih bolesnika (9.76%). Sa IFA „in house“ antigenom procenat seropozitivnih je iznosio 60.98% a sa komercijalnim antigenom je bio 65,85%. Analizom rezultata dobijenih sa 3 ELISA testa procenat pozitivnih kretao se od 19.51% do 53.85%, dok su kod 36.11 obolelih potvrđena IgM antitela u cerebrospinalnoj tečnosti, što je apsolutna potvrda infekcije u toku. Slični rezultati dobijeni su i testiranjem 112 seruma tokom epidemije 2013. godine sa tim što su procenti seropozitivnih nalaza znatno viši nego u 2012. godini i kreću se od 16.22% u AGID-u do 97.3% u ELISA testu sa IgM komercijalnim antigenom. Rezultati pokazuju jasno povećanje broja pozitivnih uzoraka tokom godina ispitivanja.

Analizirajući dobijene rezultate prikazane na Tabelama 1 i 2 u Prilogu 1 uočljiva je činjenica da u epidemijskoj 2012 godini kod jedanaest hospitalizovanih bolesnika od ukupno 41 testiranih, ni sa jednom od 6 primenjenih seroloških testova nisu otkrivena *WNV* antitela a krvna slika i biohemijski nalazi ukazivali su da se radi o bolesti virusne etiologije. Postoje publikacije da u R. Srbiji cirkuliše nekoliko primarno neurotrofnih virusa (Napuljska papatačijeva groznica, Tahyna virus, Jug Bogdanovac virus), koji

izazivaju slične kliničke simptome kod ljudi kao *WNV*, a prenose se hematofagnim artropodama, koji se prehranjuju na ljudima i životinjama (Pfeffer et al., 2013., Gligić et al., 1976., Gligić et al., 1982., Gligić et al., 1983.) te ovi rezultati zahtevaju dalja istraživanja radi dobijanja tačne etiološke dijagnoze.

Jedan broj sumnjivih nalaza u pojedinim testovima bio je potvrđen ili odbačen rezultatima drugih testova.

Sigurno da se u sagledavanju i tumačenju dobijenih rezultata mora imati na umu i o postojanju celularnog imuniteta, individualnog imuniteta, genetskog imuniteta, prirodnog imuniteta (imunitet vrste, ne obolevaju sva živa bića od *WNV* infekcije).

Upoređivanjem rezultata dijagnostičkih testova preko metoda opisanih u radu Enoe et al., 2000 na ukupnom broju uzoraka seruma ljudi iz 2012. i 2013. godine dobijeni su sledeći rezultati:

„*In house*“ test indirektne imunofluorescencije u poređenju sa komercijalno dostupnim testom je pokazao osetljivost od 89% i specifičnost od 62%. Razliku odnosno niže vrednosti u dobijenim vrednostima osetljivosti i specifičnosti za „*in house*“ test indirektne imunofluorescencije tumačimo kriterijumima procene pozitivnosti testa pri čemu su slabo pozitivni uzorci označavani kao sumnjivi i nisu potom ulazili u statističku obradu.

„*In house*“ imunoenzimski test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom je pokazao osetljivost od 20% i specifičnost od 84%. Niska vrednost osetljivosti „*in house*“ imunoenzimskog testa pripisujemo visokoj graničnoj vrednosti uzetoj radi dobijanja više specifičnosti.

Agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ testom indirektne imunofluorescencije je pokazao osetljivost od 17% i specifičnost od 94,5%, a agar gel imunodifuzioni test u poređenju sa „*in house*“ imunoenzimskim testom je pokazao osetljivost od 13,2% i specifičnost od 86,8%. Iz ovih rezultata proizilazi da agar gel imunodifuzioni test predstavlja korisan test u smislu da su svi registrovani pozitivni uzorci potvrđeno bili pozitivni i primenom drugih testova, a niska osetljivost testa je verovatno posledica ograničenog vremena za detekciju precipitinskih antitela.

Uzorci poreklom od konja

Prilikom ispitivanja uzoraka krvnih seruma poreklom od konja, iz zbirnih rezultata u predepidemijskoj godini *WNV* antitela reakcijom AGID nisu nađena u 21 uzorku seruma konja iz 2011. godine, ali su detektovana metodama IFA i ELISA testovima, kako sa antigenima pripremljenim u laboratoriji u kojoj su sprovedena istraživanja tako i sa dostupnim komercijalnim antigenima. Procenat pozitivnih kretao se od 9.52% do 40.0% (Tabela 31). Iz tabele 21. vidi se da su to bile životinje samo sa dva lokaliteta: hipodroma Beograd i hipodroma Požarevac. U 2012. godini, kada je testiran veći broj uzoraka konja (135) sa 4 lokaliteta (Požarevac, Šabac, Subotica i šire područje Beograda) procenat seropozitivnih konja testom AGID-a bio je 8.63% (Tabela 31), dok se testovima IFA i ELISA procenat pozitivnih kretao od 25.93 do 32.30%. Najveći procenat seropozitivnih nađen je kod konja uzorkovanih u Beogradu i široj okolini Beograda, dok je testirani konj iz Subotice sa neurološkim smetnjama bio seronegativan (Tabela 25). Iste godine izbila je u R. Srbiji prva epidemija *WNV* groznice, najveća u Evropi i sa najvećim brojem letalnih ishoda tokom 2012. godine (Popović et al., 2013).

U epidemijskoj 2013. godini testirano je 85 seruma konja sa 7 različitih lokaliteta, uključujući: Staru Planinu (Gornji Krivodol), Pančevo, Leskovac, Banatski Karlovac, šira okolina Novog Sada; Bačka Topola (Zobnatica) i Sremska Mitrovica. (Tabela 21) Ni u jednom od 85 testiranih seruma nisu nađena *WNV* antitela metodom AGID, a procenat pozitivnih u IFA testu „*in house*“ proizvodnje iznosio je 48.24% dok je sa istom metodom i komercijalnim antigenom taj procenat iznosio 40.48%. U ELISA testovima na istom uzorku taj procenat je bio od 17.65- 40.06% zavisno od antigena, odnosno testa (Tabela 31). Uočljivo je da se u svim testovima osim AGID-a i „*in house*“ ELISA testa vidi povećanje seroprevalencije tokom godina ispitivanja. Ovi nalazi kod ova dva testa se mogu objasniti manjim brojem uzoraka, iz samo dva lokaliteta, ispitanih tokom 2011. godine. Odsustvo pozitivnih nalaza tokom 2013. godine testom AGID se može pripisati vremenu uzorkovanja, kao i lokalitetima uzorkovanja, pošto se precipitinska antitela najranije mogu otkriti posle 3 nedelje od početka infekcije, a održavaju se do 4 meseca od momenta infekcije (Gligić 1979). Do 2013. godine, kada su uzorkovani serumi, veći deo populacije je verovatno već razvio imunitet tokom prethodnih godina. Nižu seroprevalenciju sa „*in house*“ ELISA testom, pripisujemo karakteristikama samog testa (visoka granična vrednost). Kada se

posmatraju ukupni rezultati, metoda IFA se pokazala najpogodnija za dijagnostiku kontakta konja sa *WNV*.

Uzorci poreklom od pasa

Zbirni rezultati testiranja 184 pasa, uzorkovanih od 2011.-2013. godine dati su u Tabeli 37. U reakcijama AGID-a u nijednom uzorku seruma pasa od 184 testiranih nisu nađena *WNV* antitela dok se IFA metoda (sa „*in house*“ antigenom i sa dostupnim komercijalnim IFA antigenom) nije pokazala adekvatnom za serološku dijagnostiku kod pasa usled nespecifičnih reakcija koje su onemogućile dobijanje pouzdanih rezultata. U ELISA testu, sa antigenom „*in house*“ procenat seropozitivnih pasa na *WNV* kretao se od 9.46% u 2012, 21,25% u 2013. godini, a najveći je bio 2011. godine - 33.33%. Sa komercijalnim ELISA testom, procenat seropozitivnih kretao se od 9.30% za 2011. do 38.60% za 2013. godinu (Tabela 37).

Ako se ovi rezultati analiziraju povezano sa lokalitetima uzorkovanja seruma pasa, (Prilog 3), jasno se vidi da najveći procenat seropozitivnih pasa potiču sa lokaliteta sa kojih potiče i veliki broj hospitalizovanih ljudi od *WNV* groznice u epidemijama 2012. i 2013. godine, kao što su Beograd sa okolinom (41.66%), Loznica (20%), Pančevo (80%), Sremska Mitrovica (70%) (Tabela 36). Opisana mesta obiluju kako rečnim tokovima, tako i stajaćim vodama koji su odlični uslovi za razvoj vektora, kao i njihovih prehranioca što sve pogoduje naglom širenju virusa kako među životinjama tako i među ljudima. Poznavanje imunog statusa i seroprevalencije za *WNV* kod pasa ima veliki značaj, pošto psi žive i dele isti stambeni i urbani prostor sa ljudima, a virusom se inficiraju preko komaraca u stanu ili prilikom šetnje kroz parkove i zelene površine. Tako inficiran pas u fazi viremije, pretpostavljamo, može da bude izvor infekcije za čoveka preko komaraca. U retkim slučajevima, isto kao i kod ljudi mogu da se razviju teške neurološke i druge smetnje sa smrtnim ishodom (Read et al., 2005; Lichtensteiger et al., 2003; Buckweitz et al., 2003).

Kada se sa svih aspekata razmotri pojava WN virusa na jednoj teritoriji ne zna se šta se sve očekivati: pomor na farmama ćuraka, gusaka nojeva i druge živine, epizootije kod konja - kao visokovrednih životinja, pasa i drugih životinja i/ili bolničko zbrinjavanje u kratkom periodu (Juni-Septembar) stotine obolelih od *WNV* infekcije. Tako da ovi rezultati, kao i rezultati drugih autora u R. Srbiji (Hrnjaković Cvjetković i

sar., 2007; Đuričić i sar., 2011; Lupulović i sar., 2011; Samokovlija i sar., 2012; Đuričić et al., 2013; Medić et al., 2014; Petrić et al., 2012; Popović et al., 2013; Petrović et al., 2012; Escribano-Romero et al., 2015) su od velike pomoći o odabiru dijagnostičkih metoda i proizvođača dijagnostičkih testova, kako bi se najbrže moguće pristupilo detekciji i praćenju ovog virusa na određenoj teritoriji i preduzele sve potrebne i neophodne preventivne mere. Dobro poznavanje veza i odnosa u utvrđenom prirodnom žarištu u kojem se neprekidno odvija proces kruženja *WNV*, osnovni je preduslov za shvatanje ne samo epizootiološkog, već i za razmatranje epidemijskog procesa i svih njegovih manifestacija, što čini osnovu za planiranje zaštitnih mera.

7. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu ispitivanja seroprevalencije kod konja, pasa i ljudi na 15 različitih lokaliteta Republike Srbije može se reći da je *WNV* široko rasprostranjen sa naglaskom na područja u slivovima velikih reka prvenstveno Save i Dunava.
2. Seroprevalencija *WNV* je u porastu tokom godina kod svih ispitivanih vrsta životinja i ljudi.
3. Od primenjenih dijagnostičkih metoda i testova kao najpogodniji (po karakteristikama osetljivosti i specifičnosti) se pokazao metod IFA za serološku dijagnostiku infekcije *WNV* kod konja i ljudi, dok je kod pasa to ELISA metod. AGID je pokazao nisku osetljivost kod sve tri vrste što predstavlja značajno ograničenje u upotrebi ovog testa.
4. IFA testove nije moguće raditi sa uzorcima poreklom od pasa usled nespecifične reakcije.
5. Nisu utvđene statistički značajne razlike između „*in house*“ i komercijalno dostupnih IFA i ELISA testova na uzorcima seruma konja i ljudi, dok su postojale statistički značajne razlike između ELISA testova kod pasa.
6. Utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike samo između AGID i „*in house*“ ELISA testa i AGID i komercijalno dostupnog ELISA IgG testa na uzorcima poreklom od ljudi, dok su postojale značajne razlike između testova na uzorcima konja i pasa.
7. Osetljivost i specifičnost testova je varirala u odnosu na ispitivanu vrstu. „*In house*“ IFA test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom sa uzorcima ljudi imao je osetljivost od 89% i specifičnost 62%, dok je sa uzorcima konja utvrđena osetljivost od 94% i specifičnost od 90%. „*In house*“ ELISA test u poređenju sa komercijalno dostupnim testom kod ljudi je pokazao osetljivost od 20% i specifičnost od 84%, dok su kod konja one iznosile 26% i 70%, a kod pasa 0% i 87,5%. AGID test u poređenju sa „*in house*“ IFA testom kod uzoraka ljudi je pokazao osetljivost od 17% i specifičnost 94,5%, odnosno 0% i 100% kod testiranja uzoraka konja. U poređenju sa „*in house*“ ELISA testom, AGID test je pokazao osetljivost od 13,2% i specifičnost od 86,8% kod ljudi, odnosno 48% i 100% sa uzorcima poreklom od konja.

8. U cilju kontrole pojave bolesti kod prijemčivih vrsta potrebno je sprovoditi mere za kontrolu populacije vektora, ali i konstantni monitoring stanja prijemčivih vrsta i prisustva virusa u prirodi.

8. SPISAK LITERATURE

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE Terrestrial Manual-Chapter 2.1.20., 2013.)
2. Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul, J.H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.* 20: 471-492.
3. International Comitee on Taxonomy of Viruses
http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4825.aspx
4. Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. and Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyvalent antisera. *Journal of General Virology* 70, 37–43.
5. Deubel, V., Fiette, L., Gounon, P., Drouet, M.T., Khun, H., Huerre, M., Banet, C., Malkinson M., Despres, P. (2001). Variations in Biological Features of West Nile Viruses, *Ann N Y Acad Sci.*, 951:195-206.
6. Petersen, L.R. and Roehrig, J.T (2001). West Nile virus: A Reemerging Global Pathogen. *Emerg.Infect Diseases*, Vol 7, No.4, pp 611-614.
7. Samuel, M.A., and Diamond, M.S. (2006). Pathogenesis of West Nile virus infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion *J. Virol.* 2006, 80(19):9349-9360.
8. Ahmadnejad, F. (2012). West Nile Virus Circulation in Equine Population from Iran: Epidemiological Impact of Environment and Climate. Doctoral Thesis, University of Grenoble

9. Lanciotti, R. S., Roehrig J.T., Deubel V., Smith J., Parker M., Steele K., Crise B., Volpe K.E., Cravtree M.B., Scherret J.H., Hall R.A., MacKanzie J.S., Cropp C.B., Panigrahy B., Ostlund E., Schmitt B., Malkinson M., Banet C., Weissman J., Komar N., Savage H.M., Stone W., McNamara T, Gubler D.J. (1999). Origin of the West Nile Virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science* 286:2333-2337
10. Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N. (2005). Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.11, No2, 225-231
11. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging–reemerging situations. *Arch Virol Suppl.* 2004;18:85–96.
12. Bondre V.P., Jadi R.S., Mishra A.C., Yergolkar P.N., Arankalle V.A.(2007). West Nile virus isolates from India:evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*,Vol.88, No3, 875-884.
13. Hall R.A., Scherret J.H., Mackenzie J.S.(2001). Kunjin virus:an Australian variant of West Nile? *Ann N Y Acad Sci* 2001 Dec;951:153-60.
14. Scherret J.H., Poidinger M., Mackenzie J.S., Broom A.K., Deubel V., Lipkin W.I. et al. (2001). The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis*, 2001;7:697-705.
15. Vazquez A., Sanchez-Seco M.P., Ruiz S., Molero F., Hernandez L., Moreno J., Magallanes A., Gomez Tejedor C., Tenorio A.(2010). Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases* Vol.16. No3. 549-552.

16. Burt FJ, Grobbelaar AA, Leman PA, Anthony FS, Gibson GV, Swanepoel R. Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:820-6
17. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006;12:618-23.
18. Barzon L., Papa A., Pacenti M., Franchin E., Lavezzo E., Squarzon L., Masi G., Martello T., Testa T., Cusinato R., Palu G. (2013). Genome Sequencing of West Nile Virus from Human Cases in Greece, 2012. *Viruses* 2013, 5, 2311-2319.
19. Petrović T., Blazquez A.B., Lupulović D., Lazić G., Escribano-Romero E., Fabijan D., Kapetanov M., Lazić S., Saiz J.C. (2013). Monitoring West Nile virus (*WNV*) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of *WNV* strains from Serbia. *Euro Surveill.* 2013;18(44):pii:20622.
20. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. (2014). Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis* 20(12):2119-22.
21. www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/mosquito_species_1999-2012.pdf
22. Hubalek, Z. And Halouzka J. (1999). West Nile Fever- a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg.Infect.Diseases* Vol.5.No 5. 643-650
23. Petrić, D., Zgomba, M., Ignjatović Čupina, A., Marinković, D., Bellini, R., Schaffner, F., Pajović, I. (2012). Invasive mosquito species in Europe and Serbia, 1979-2011. International Symposium on current trends in plant protection with ESENIAS workshop-managing invasive alien species in SE countries:The way ahead, Belgrade, September 2012.

24. Scholte, E-J., Braks, M., Schaffner, F.(2010). Aircraft-mediated transport of *Culex quinquefasciatus*. A case report. *European Mosquito Bulletin* 28 (2010), pp.208-212.

25. Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Dohm, D.J., Jones J.W. (2001). Vector Competence of North American Mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) for West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology* 38(2):130-134. 2001 doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.130>

26. Platonov AE West Nile encephalitis in Russia 1999–2001: Were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:102–16. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02689.x.

27. L'Vov DK, Dzharkenov AF, L'Vov DN, Aristova VA, Kovtunov AI, Gromashevskii VL, et al. Isolation of the West Nile fever virus from the great cormorant *Phalacrocorax carbo*, the crow *Corvus corone*, and *Hyalomma marginatum* ticks associated with them in natural and synanthropic biocenosis in the Volga delta (Astrakhan region, 2001). *Vopr Virusol.* 2002;47:7–12.

28. Lawrie, C.H., Uzcategui N.Y., Gould, E.A., Nuttall, P.A.(2004). Ixodid and Argasid Tick Species and West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.*10(4):653-657.

29. Komar, N. (2000) West Nile viral encephalitis. *Revue du Science et Technologie Office International des Epizooties* 19, 166–176.

30. McLean, R.G., Ubico, S.R., Docherty, D.E., Hansen, W.R., Sileo, L. and McNamara, T.S. (2001) West Nile virus transmission and ecology in birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 951,54–57.

31. Lichtensteiger, C. A., K. Heinz-Tahney, T. S. Osborne, R. J. Novak, B. A. Lewis, and M. L. Firth. 2003. West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerging Infectious Diseases* 9:1303–1306.
32. Madic, J., D. Huber, and B. Lugovic. 1993. Serological survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases* 29:572–576.
33. Del Piero, F., Stremme, D.W., Habecker, L., Cantile, C. (2006) West Nile Flavivirus Polioencephalomyelitis in a Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Vet Pathol* 2006 43:58.
34. Leger, J.St., Wu, G., Anderson, M., Dalton, L., Nilson, E., Wang, D. (2011). West Nile Virus Infection in Killer Whale, Texas, USA, 2007. *Emerg Infect Diseases*, Vol.17, No 8, 1531-1533.
35. Miller, D.L., Mauel, M.J., Baldwin C., Burtle G., Dallas, I., Hines II, M.E., Frazier, K.S (2003). West Nile Virus in Farmed Alligators. *Emerg. Infect. Diseases*, Vol.9, No.7, 794-799.
36. Ebel G., D., Dupuis II, A.P., Nicholas, D., Young, D., Maffei, J and Kramer., L.D. (2002). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of antibodies to West Nile virus in Birds. *Emerg. Infect. Diseases*, Vol.8, No 9, 979-982
37. Ng, M.L. and Lau, L.C.L.(1988). Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells, *Arch.Virol.*100:199-211.
38. Davis CW, et al. (2006). West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J. Virol.*80:1290–1301.

39. Colpitts, T.M., Conway M. J., Montgomery, R.R., Erol Fikrig (2012). West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev* 2012, 25(4):635.
40. Chu, J. J., and M. L. Ng. (2004). Interaction of West Nile virus with $\alpha_v\beta_3$ integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* 279:54533-54541.
41. Schmidt, K (2012). Cellular factors modulating the entry efficiency of West Nile virus-Involvement of integrins, Thesis, University of Hannover
42. Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J. et al. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71:8475-8481.
43. Lim, S.M., Koraka, P., Osterhaus, A.D.M.E., Byron, E.E.M.(2011) West Nile virus: Immunity and Pathogenesis, *Viruses*, 2011, 3, 811-828.
44. Diamond, M. S., Sitati, E. M., Friend, L. D., Higgs, S., Shrestha B., and Engle M. (2003). A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* 198:1853-1862.
45. Ben-Nathan, D., Huitinga, I., Lustig, S., van Rooijen, N., Kobiler, D. (1996) West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice. *Arch Virol* (1996) 141:459-469.
46. Kreil, T. R., and Eibl. M. M. (1996). Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. *Virology* 219:304-306.
47. Liu, V. and Mollbacher, A. (1988). Astrocytes are not susceptible to natural killer cell lysis. *Journal of Neuroimmunology* 19, 101-110.

48. Carding, S. R., and Egan, P. J. (2002). $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:336-345.
49. Mehlhop, E., and Diamond, M. S. 2006. Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J. Exp. Med.* 203:1371-1381.
50. Samuel, M.A. and Diamond, M.S.(2005). Type I IFN protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J. Virol.* 79:13350-13361.
51. Shrestha, B., Wang, T., Samuel, M.A., Whitby, K., Craft, J., Fikrig, E., Diamond M.S. (2006) Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection, *J. Virol*, 80:5338-5348.
52. Diamond, M.S., Shrestha, B., Marri, A., Mahan, D., Engle, M. (2003) B Cells and Antibody Play Critical Roles in the Immediate Defense of Disseminated Infection by West Nile Encephalitis Virus, *J. Virol* 77(4):2578-2586.
53. Roehrig J.T., Nash D., Maldin B., Labowitz A., Martin D.A., Lanciotti R.S., Campbell G.L. (2003) Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (3) 376-379.
54. Sitati, E.M., Diamond, M.S. (2006). CD4⁺ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J. Virol.* 2006, 80, 12060-12069.

55. Shrestha, B.,Diamond, M.S. (2004). Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J.Virol.*, 78, 8312-8321.
56. Commision Decision C(2009)2351 of 2 April 2009 amending Decision 2000/96/EC as regards dedicated surveillance networks for communicable diseases- 2009/312/EC, Official Journal of the European Union, L 91/27, 03.04.2009.
57. Commision Decision f 28/IV/2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council
58. Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases, West Nile Virus in the United States:Guidelines for Surveillance, Prevention and Control, 4th Revision, 14 June 2013.
59. USDA-APHIS-VS-CEAH National surveillance unit, Case definition for West Nile virus, September 15, 2011. Available on-line: http://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/equine/wnv/case_definition_west_nile_virus_09_15_11.pdf
60. Ward, M.P., Levy, M., Thacker, H.L., Ash, M., Norman, S.K., Moore, G.E., et al.(2004). Investigation of as outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *J Am Vet Med Assoc.* 225:84-9.
61. Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C, Arispici, M. (2010) Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Eqine vet. J.* (2000) 32 (1) 31-35.
62. Trock, S.C., Meade, B.J., Glaser, A.L., Ostlund, E.N., Lanciotti,R.S., Cropp, B.C., Kulasekera, V., Kramer, L.D., Komar, N. (2000). West Nile Virus Outbreak Among Horses in New York State, 1999 and 2000.*Emerg. Infect. Dis.* 7(4), 745-747.

63. Venter, M., Human, S., Zaayman, D., Gerdes, G.H., Williams, J., Steyl, J., Leman, P., Paweska, J.P., Setzkorn, H., Rous, G., Murray, S., Parker, R., Donnellan, C., Swanepoel, R. (2009). Lineage 2 West Nile Virus as Cause of Fatal Neurological Disease in Horses, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15(6):877-884.
64. Read, R.W., Rodriguez, D.B., Summers, B.A. (2005): West Nile virus encephalitis in a dog, *Vet Pathol.* 42 (2):219-22.
65. Austgen L.E., Bowen, R.A., Bunning M.L., Davis B.S., Mitchell C.J., Gwong-Jen J.C. (2004): Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis* [serial online] 2004 Jan [date cited]. Available from: URL: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/1/02-0616>
66. Simpson, V.R., Kuebart, G. (1979), A fatal case of Wesselsbron disease in a dog, *Vet. Rec.* 105:329.
67. Buckweitz, S., Kleiboeker, S., Marioni, K., Vara, HR, Rottinghaus, A, Schwabenton, B., Johnson, G. (2003): Serological, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and immunohistochemical detection of West Nile virus in a clinically affected dog, *J Vet Diagn Invest* 15:324-329.
68. Bodewes, R., Egberink, H. (2009): An update on viral diseases of dog and cat: *Tijdschr Diergeneeskd* 134(8) 330-6
69. <http://www.batut.org.rs/index.php?content=940>
70. Popović N, Milošević B, Urošević A, Poluga J, Lavadinović L, Nedeljković J, Jevtović D, Dulović O. Outbreak of West Nile virus infection among humans in

Serbia, August to October 2012 . Euro Surveill. 2013;18(43):pii=20613. Available online <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20613>

71. Guarner, J., Wun-Ju, S., Hunter, S., Paddock, C.R., Morken, T., Campbell G.L., Marfin, A.A., Zaki, S.R. (2004). Clinicopathologic Study and Laboratory Diagnosis of 23 Cases with West Nile Virus Encephalomyelitis, *Human Pathology*, Vol.35, No 8, 983-990.
72. Bernkopf, H., Levine, S., Nerson,R. (1953). Isolation of West Nile virus in Israel. *J.Infect.Dis.* Vol.93, No3.
73. Chowers, M.Y., Lang R., Nassar, F., Ben-David D., Giladi, M., Rubinshtein E., Itzhaki, A., Mishal, J., Siegman-Igra Y., Kitzes, R., Pick, N., Landau Z., Wolf, D., Bin, H.,Mendelson E., Pitlik S.D., Weinberger, M.(2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis* 7(4):675-678.
74. Taylor, R.M., Work T.H., Hurlbut, H.S (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt.*Am.J. Trop.Med.Hyg.* 5(4):579-620.
75. Work, T.H., Hurlbut, H.S., Taylor R.M. (1955). Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 4:872-888.
76. Schmidt, J.R., El Mansoury, H.K. (1963). Natural and experimental infection of Egyptian equine with West Nile virus. *Ann. Trop.Med. Parasitol.*57:415-427.
77. McIntosh, B.M., Jupp, P.G., Dos Santos, I., Meenehan, G.M.(1976). Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*, vol.72, no 10, pp 295-300.

78. Bárdoš V, Adamcová J, Dedei S, Gjini N, Rosický B, Šimková A. Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology (Prague)* 1959;3:277-82.
79. Panthier R, Hannoun C, Beytout D, Mouchet J. Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. III. Les maladies humaines. *Annales de l'Institut Pasteur* 1968;115:435-45.
80. Joubert L, Oudar J, Hannoun C, Beytout D, Corniou B, Guillon et al. Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Annales de l'Institut Pasteur* 1970;118:239-47.
81. Hannoun C, Panthier R, Mouchet J, Eouzan JP.(1964). Isolement en France du virus West Nile à partir de malades et du vecteur *Culex molestus* Ficalbi. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences* 1964;D259:4170-2.
82. Chumakov MP, Belyaeva AP, Butenko AM. Isolation and study of an original virus from *Hyalomma plumbeum plumbeum* ticks and from the blood of a febrile patient in the Astrakhan region (in Russian). *Materialy XI Nauchnoi Sessii Instituta Poliomiélita i Virusnykh Encefalítov (Moskva)* 1964:5-7.
83. Borđoški M., Gligić A., Boškovič R. (1972). Arbovirusne infekcije u SR Srbiji. *Vojnosanit Pregl* 1972;29(4):173-175.
84. Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., Zeller H.G. (2001). West Nile in the Mediterranean basin:1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 951, West Nile virus:detection, surveillance and control, 117-126.

85. Tsai, T.F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G.L., Nedelcu, N.I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania, *The Lancet*, Vol.351, Issue 9130, 767-771.
86. Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., Tsai, T.F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitos. *Am J Trop Med Hyg.* Vol 61., no 4, 600-611.
87. Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J.P., Zeller, H. (2001). West Nile Outbreak in Horses in Southern France, 2000: The Return after 35 years. *Emerg Infect Diseases*, Vol.7, No4, 692-696.
88. Centers for Disease Control and Prevention Outbreak of West Nile-like viral encephalitis—New York, 1999 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 48 (1999), pp. 845–859.
89. Campbell, G.L., Marfin, A.A., Lanciotti, R.S., Gubler, D.J. (2002). West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol.2, Issue 9, 519-529.
90. Komar N. and Clark G.G. (2006). West Nile Virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(2):112-7.
91. Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H. & Nowotny, N. (2006) Emergence of lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus in central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 12, 618-623.
92. Barbić Lj, Listeš E., Katić S., Stevanović V., Madić J., Starešina V., Labrović A., Di Gennaro A., Savini G. (2012). Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Veterinary Microbiology* 159 (2012) 504-508.

93. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000012272_20120905_164912.pdf
94. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000015722_20140725_172949.pdf
95. Ozkul A., Yildirim Y., Pinar D., Akcali A., Yilmaz V., Colak D. (2006). Serological evidence of West Nile Virus (*WNV*) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol. Infect.* 2006;134(4):826-829.
96. Ozkul A., Ergunay K., Koysuren A., Alkan F., Arsava E.M., Tezcan S., Emekdas G., Hacıoglu S., Turan M., Us D.(2013). Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey:the first evidence for circulation of lineage 1 viruses, *International Journal of Infectious Diseases*, Vol.17, Issue 7, 546-551.
97. Erdelyi K., Ursu K., Ferenczi E., Szeredi L., Ratz F., Skare J., Bakonyi T. (2007).Clinical and Pathologic Features of Lineage 2 West Nile Virus Infections in Birds of Prey in Hungary.*Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 7(2):181-188.doi:10.1089/vbz.2006.0586.
98. Glavits R., Ferenczi E., Ivanics E., Bakonyi T., Mato T., Zarka P, Palya V.(2005) Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathology*, Vol.35, Issue 5., 408-414.
99. Kutasi O., Bakonyi T., Lecollinet S., Biksi I., Ferenzi E., Bahuon C., Sardi S., Zientara S., Szenci O. (2011). Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol.25, Issue 3, 586-591.

100. Bakonyi T., Ferenczi E., Erdelyi K., Kutasi O., Csorgo T., Seidel B., Weissenbock H., Brugger K., Ban E., Nowotny N. (2013). Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology* 165 (2013) 61-70.
101. Wodak., E., Richter S., Bago Z., Revilla-Fernandez S., Weissenbock H., Nowotny N., Winter P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary Microbiology*, Vol 149, Issue 3-4, 358-366.
102. Macini P, Squintani G, Finarelli AC, Angelini P, Martini E, Tamba M, Dottori M, Bellini R, Santi A, Loli Piccolomini L, Po C. Detection of West Nile virus infection in horses, Italy, September 2008. *Euro Surveill.* 2008;13(39):pii=18990. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18990>
103. Calistri P., Giovannini A., Savini G., Monaco F., Bonfanti L., Ceolin C., Terregino C., Tamba M., Cordioli P., Lelli R. (2010). West Nile Virus Transmission in 2008 in North-Eastern Italy. *Zoonoses and Public Health*, Vol.57, Issue 3, 211-219.
104. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000009680_20100907_181428.pdf
105. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000009710_20100914_162700.pdf
106. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000009736_20100920_173638.pdf

107. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000010114_20101229_135753.pdf
108. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000011407_20111221_153647.pdf
109. Monaco F., Goffredo M, Briquoglio P., Pinoni C., Polci a., Iannetti S., Marruchella G., Di Francesco G., Di Gennaro AP., Pais M., Teodori L., Bruno R., Catalani M., Ruiiu A., Lelli R., Savini G. (2015). The 2011 West Nile disease outbreak in Sardinia region, Italy. *Vet. Ital.* 51(1):5-16.
110. Rovida F., Sarasini A., Campanini G., Percivalle E., Gorini G., Mariani B., Pan A., Possenti S., Manzini L., Castelli F., Bossini N., Grossi PA., Castilletti C., Calzolari M., Lelli D., Piatti A., Baldanti F. (2015) West Nile virus outbreak in the Lombardy region, northern Italy, summer 2013. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 15(4):278-83.
111. Mailles A., Dellamonica P., Zeller H., Durand J.P., Zientara S., Goffette R., Gloaguen C., Armengaud A., Schaffner F., Hars J., Chodorge E., Barbat J. (2003). Human and equine West Nile virus infections in France, August-September 2003. *Euro Surveill.* 2003;7(43):pii=2312. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2312>
112. Zeller H., Zientara S., Hars J., LAnguille J., Mailles A., Tolou H., Paty M.C., Schaffner F., Armengaud A., Gaillan P., Legras J.F., Hendrikx P. (2004). West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004, *Euro Surveill.* 2004;8(41):pii=2564. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2564>
113. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/reportarchive

114. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000009695_20100910_170647.pdf
115. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000011273_20111110_172852.pdf
116. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000009793_20101006_170815.pdf
117. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000010112_20101230_171000.pdf
118. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000009879_20101027_174146.pdf
119. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000011423_20111226_151341.pdf
120. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000014147_20130925_144410.pdf
121. www.ecdc.europa.eu
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/historical-data.aspx
122. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, Theocharopoulos G, Chrysagis D, Vassiliadou E, Kamaria F, Liona A, Mellou K, Saroglou G, Panagiotopoulos T. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July – August 2010. Euro Surveill. 2010;15(34):pii=19644. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19644>

123. Danis, K., Papa A., Theocharopoulos G., Dougas G., Athanasiou M., Detsis M., Baka A., Lytras T., Mellou K., Bonovas S., Panagiotopoulos T. (2011). Outbreak of West Nile Virus Infection in Greece, 2010, *Emerging Infectious Diseases*, Vol 17. No 10, 2011.
124. Papa A., Xanthopoulou K., Gewehr S, Mourelatos S. (2011). Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:1176-1180, doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03438.x
125. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vasquez A., Tenorio A., Nowotny N. (2011) Genetic Characterization of West Nile Virus Lineage 2, Greece, 2010, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.17, No.5, *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2011 May [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101759> DOI: 10.3201/eid1705.101759
126. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vázquez A, Tenorio A, Rebreanu R, Niedrig M, Nicolescu G, Pistol A. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill*. 2011;16(2):pii=19762. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19762>
127. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, Gozalan A, Uyar Y, Caglayik DY, Atasoylu G, Altas AB, Yolbakan S, Ozden TN, Bayraktar F, Sezak N, Pelitli TS, Kurtcebe ZO, Aydın E, Ertek M. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*. 2012;17(21):pii=20182. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20182>
128. Rizzo C, Salcuni P, Nicoletti L, Ciufolini MG, Russo F, Masala R, Frongia O, Finarelli AC, Gramegna M, Gallo L, Pompa MG, Rezza G, Salmaso S, Declich

- S. Epidemiological surveillance of West Nile neuroinvasive diseases in Italy, 2008 to 2011. *Euro Surveill.* 2012;17(20):pii=20172. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20172>
129. Savini G., Capelli, G., Monaco F., Polci A., Russo F., Di Gennaro A., Marini V., Teodori L., Montarsi F., Pinoni C., Piscicella M., Terregino C., Marangon S., Capua I., Lelli R. (2012) Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Veterinary Microbiology*, Vol.158, Issue 3-4, 267-273.
130. Bagnarelli, K. Marinelli, D. Trotta, A. Monachetti, M. Tavio, R. Del Gobbo, M.R. Capobianchi, S. Menzo, L. Nicoletti, F. Magurano, P.E. Varaldo. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011 *Euro Surveill.*, 16 (43) (2011) pii=20002. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20002>.
131. Hrnjaković Cvjetković I., Milošević V., Patić J., Kovačević G., Radovanov Tadić J., Sanchez-Seco P. et al. (2007) Surveillance of West Nile virus in Vojvodina, Abstract book, 5th Balkan Congress for Microbiology, 24-27th October, 2007, Budva, pp.58-59.
132. Tasić D., Rakonjac B., Đurić M., Stajković N., Krstić M., Kuljić Kapuljica N. (2008). Dokazivanje antitela prema virusu zapadnog Nila. VI kongres medicinske mikrobiologije, 11-14 jun 2008., Beograd, pp. 197-198.
133. Đuričić B., Samokovlija A., Nowotny N., Gligić A. (2011). West Nile infection in Serbia. Proceedings, First International Epizootiology days. Sijarinska spa, 6-9th April, 2011, pp.13-14.
134. Lupulovic D, Martín-Acebes MA, Lazic S, Alonso-Padilla J, Blázquez A-, Escribano-Romero E, Petrovic T, Saiz JC (2011) First serological evidence of

- West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1303-1305.
135. Samokovlija A., Vojinović D., Rogožarski D., Elezović M., Marić J., Gligić A., Đuričić B. (2012). Epizootiological and serological investigation of West Nile fever in central part of Serbia during 2011. *Proceedings, Second international epizootiology days, Belgrade, 18-21st April 2012*.pp 55-59.
 136. Đuričić B., Vasić A., Rogožarski D., Vojinović D., Elezović Radovanović M., Manić M., Marić J., Prokić N., Ilić Ž., Nowotny N., Gligić A. (2013). Seroepizootiological-epidemiological investigation and mapping of West Nile infection in the Republic of Serbia. *Acta Veterinaria (Beograd)*, Vol.63, No 5-6, 569-579.
 137. Medić S., Ven Den Hoven R., Petrović T., Lupulović D., Nowotny N. (2014). Serological evidence of West Nile virus infection in the horse population of northern Serbia. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(7):914-918.doi:10.3855/jidc.3885.
 138. Petric D., Hrnjakovic Cvjetkovic I., Radovanov J., Cvjetkovic D., Jerant Patić V., Milosevic V., Gordana K., Zgomba M., Ignjatovic Cupina A., Konjevic A., Dusan M., M Paz Sánchez-Seco. West nile virus surveillance in humans and mosquitoes and detection of cell fusing agent virus in Vojvodina province (Serbia). *HealthMED – Vol. 6, No 2, 2012*, 462-468.
 139. Petrović T., Petrić D., Hrnjaković Cvjetković I., Lupulović D., Ignjatović Čupina A., Milošević V., Zgomba M., Lazić S., Saiz J.C.(2013)Update on the epidemiology of WN virus in Serbia, *EuroWestNile, Newsletter no 4, July 2013*.
 140. Escribano-Romero E., Lupulović D., Merino-Ramos T., Blazquez AB., Lazić G., Lazić S., Saiz JC, Petrović T. (2015). West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Vet. Microbiol.* 176(3-4): 365-9.

141. OIE, Terrestrial Manual 2013, Chapter 2.1.20 West Nile Fever
142. Ouchterlony, O. (1949), Antigen-antibody reactions in gels, Acta. Path.Microb. Scand. 6, 507-515.
143. Ouchterlony, O.,(1962). Diffusion in gel methods for immunological analysis II, Allergy, 6,30, 154.
144. Casals J and Brown, L.V. (1954). Hemagglutination with arthropod-borne viruses, J. Exp Med. 99(5):429-449.
145. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193:265-275.
146. Cumakov, M.P, Rubin, A. M, Elbert, L.B, Pervukov, Ju. V.(1969). Primenenie polietilenglikolja dlja koncentraciji virusov, Voprosi virusologiji,6,721-724.
147. Frazier C.L. and Shope R.E. (1979). Detection of Antibodies to Alphaviruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Journal of Clinical Microbiology, Vol.10, No 4, 583-585.
148. Frey A., Di Canzio J., Zurakowsky D. (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. Journal of Immunological Methods 221(1998), 35-41.
149. Classen D.C., Morningstar J.M., Shanley J.D. (1987). Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. J. Clin. Microbiol. 25, 600.

150. Lan D., Ji W., Yu D., Chu J., Wang C., Yang Z., Hua X. (2011) Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China. *Arch. Vir.*, 156 (5) 893-895.
151. Enoe C., Georgiadis M.P., Johnson W.O.(2000). Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine* 45 (2000) 61-81.
152. http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/tropen_UK.pdf
153. Niedrig M., Sonnenberg K., Steinhagen K., Paweska J.T (2007): Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *Journal of Virological Methods*, vol. 139, issue 1, 103-105
154. www.id-vet.com
155. Gligić Ana (1979): Dinamika titrova antitela kod obolelih od velikih boginja, vakcinisanih lica protiv velikih boginja i eksperimentalno inficiranih životinja merena raznim metodama i njihovi međusobni odnosi. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Medicinski fakultet.
156. Niedrig M., Donoso Mantke O., Altmann D., Zeller H. (2007). First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *BMC Infectious Diseases* 2007, 7:72
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/72>
157. Sanchini A., Donoso Mantke O., Papa A., Sambri V., Teichmann A., Niedrig M. (2013). Second International Diagnostic Accuracy Study for the Serological Detection of West Nile Virus infection. *PloS negl Trop Dis* 7(4):e2184. Doi:10.1371/journal.pntd.0002184

158. ECDC (2011). Expert consultation on West Nile virus infection, meeting report, Thessaloniki, 25-26 january 2011.
159. Busch M.P., Kleinman S.H., Tobler L.H., Kamel H.T., Norris P.J., Walsh I., Matud J.L., Prince H.E., Lanciotti R.S., Wright D.J., Linnen J.M., Caglioti S. (2008). Virus and Antibody Dynamics in Acute West Nile Virus Infection. *J Infect Dis.* (2008) 198(7):984-993.
160. Pfeiffer Martin, Meik Dilcher, Robert Tesh, Frank T.Hufert and Manfred Weidmann, (2013):Genetic characterization of Jug Bogdanovac virus. *Virus Genes* (2013). 46: 201-202.
161. Gligic Ana and Adamović Ž. R. (1976): Isolation of Tahyna virus from *Aedes vexans* mosquitoes in Serbia. *Mikrobiologija* Vol.13, No. 2. 119-129.
162. Gligić Ana, Z. Mišćević, R.B. Tesh, Amelija Travassos da Rosa and Vera Živković. (1982): First isolation of naples sandfly fever virus in Yugoslavia. *Mikrobiologija*, Vol. 19., No.2., 167-175.
163. Gligić Ana, R.B. Tesh, Z. Mišćević, Amelija Travassos da Rosa and Vera Živković (1983): jug Bogdanovac virus - a new member of the Vesicular stomatitis virus serogroup (Rhabdoviridae:Vesiculovirus) isolated fromphlebotomine sandflies in Yugoslavia. *Mikrobiologija*, Vol. 20., No. 2, 97-105.

PRILOG 1

Uporedni rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi primenom 7 dijagnostičkih testova (AGID, „*in house*“ IFA, komercijalno dostupna IFA, „*in house*“ ELISA, komercijalno dostupna ELISA IgG, komercijalno dostupna ELISA IgM) prikazani su na tabelama 1 i 2.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi uzorkovanih tokom 2012. godine

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „ <i>in house</i> “	TITRACIJA IFA „ <i>in house</i> “	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „ <i>in house</i> “	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
1.	10.09.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
2.	10.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:1024++	pozitivno	negativno	pozitivno	+-	pozitivno
3.	10.09.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	pozitivno	negativno	negativno	
4.	10.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:1024++	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	+-
5.	10.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:1024+ 1:2048+-	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
6.	10.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64++	1:1024+-	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	+-
7.	11.09.2012.	sumnjivo	pozitivno 1:64++	1:2048+	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	+-
8.	11.09.2012.	sumnjivo	pozitivno 1:64+++	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno
9.	11.09.2012.	sumnjivo	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
10.	12.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048+-	pozitivno	negativno	pozitivno	+-	pozitivno
11.	12.09.2012.	sumnjivo	pozitivno 1:64+++	1:1024+-	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	Nije radjeno
12.	14.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048+-	pozitivno	Sumnjivo	pozitivno	pozitivno	pozitivno
13.	14.09.2012.	negativno	negativno	negativno	pozitivno	negativno	negativno	negativno	negativno

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
14.	14.09.2012.	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno	negativno	negativno	negativno
15.	14.09.2012.	pozitivno	susp 1:16 +-	1:16+ 1:64+-	pozitivno	negativno	negativno	negativno	negativno
16.	14.09.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno
17.	14.09.2012.	pozitivno	pozitivno 1:16+++	1:2048++	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno
18.	14.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno
19.	17.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:1024+	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno
20.	17.09.2012.	pozitivno	pozitivno 1:64++	1:2048+-	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno
21.	17.09.2012.	Sumnjivo	negativno	negativno	negativno	pozitivno			

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
22.	17.09.2012.	negativno	pozitivno 1:16++/ 1:64+-	1:1024+-	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno
23.	17.09.2012.	negativno	pozitivno 1:16++++/1:64+-	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno
24.	17.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048+-	negativno	Sumnjivo	pozitivno	+-	pozitivno
25.	20.09.2012.	Sumnjivo	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
26.	24.09.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
27.	25.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64++	1:256+, 1:1024-	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno
28.	26.09.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	+-	pozitivno
29.	26.09.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
30.	16.10.2012.	negativno	pozitivno 1:64+	1:2048+-	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	negativno
31.	16.10.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
32.	16.10.2012.	negativno	pozitivno 1:64+	1:2048+-	pozitivno	Sumnjivo	+ (od 17.10.) + (od 22.10)	pozitivno	negativno
33.	17.10.2012.	negativno	pozitivno 1:64+++	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno
34.	25.10.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
35.	26.10.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
36.	29.10.2012.	Sumnjivo	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno

Redni broj	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM
37.	01.11.2012.	negativno	pozitivno 1:16+	1:256+, 1:1024+-	pozitivno	negativno	negativno	negativno	negativno
38.	05.11.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
39.	22.11.2012.	Sumnjivo	susp.+/-	1:256+. 1:1024+-	pozitivno	pozitivno	negativno	+-	Nije radjeno
40.	22.11.2012.	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno			
41.	22.11.2012.	negativno	pozitivno 1:16++	1:1024+ 1:2048+-	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije testirano

Tabela 2. Rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi uzorkovanih tokom 2013. godine

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
1.	16.04.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64 +-	negativno	negativno				
2.	17.04.2013.	negativno	pozitivno	1:2048 ++	negativno	pozitivno				
3.	07.05.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
4.	09.05.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
5.	27.05.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64 +-	negativno	negativno				
6.	29.05.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64 +-	negativno	negativno				
7.	19.06.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64 +-	negativno	negativno				
8.	01.07.2013.	negativno	sumnjivo	1:16+	negativno	sumnjivo				
9.	02.07.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	negativno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	od 29.06.
10.	02.07.2013.	negativno	pozitivno	1:256+, 1:1024+-	pozitivno	negativno				
11.	04.07.2013.	negativno	negativno	-.	negativno	sumnjivo				
12.	05.07.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
13.	05.07.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
14.	08.07.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64+-	negativno	negativno				
15.	09.07.2013.	pozitivno	negativno		pozitivno	negativno				
16.	12.07.2013.	negativno	pozitivno	1:1024 +-	pozitivno	pozitivno				

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
17.	15.07.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
18.	22.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	19.07.
19.	22.07.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
20.	22.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	19.07.
21.	22.07.2013.	negativno	pozitivno	1:64+	pozitivno	negativno	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	21.07.
22.	22.07.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+, 1:2048+-	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	21.07.
23.	23.07.2013.	negativno	negativno		negativno	pozitivno				
24.	23.07.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64+-	negativno	sumnjivo	1.pozitivno 2.pozitivno	1.negativno 2.pozitivno	1.pozitivno 2.pozitivno	18.07.
25.	25.07.2013.	pozitivno	negativno		pozitivno	pozitivno				
26.	25.07.2013.	negativno	pozitivno	1:64+	pozitivno	negativno				
27.	25.07.2013.	negativno	pozitivno	1:16+	pozitivno	pozitivno				
28.	29.07.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	24.07.
29.	29.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	22.07.
30.	29.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	negativno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	24.07. AGID + serum

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
31.	29.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	negativno	pozitivno	25.07. AGID+ serum
32.	29.07.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	24.07.
33.	30.07.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	NT	27.07.
34.	30.07.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	20.07.
35.	31.07.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	30.07. AGID zona inhibicije
36.	02.08.2013.	negativno	pozitivno	1:128+, 1:256+-	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	30.07.
37.	05.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:512 +	pozitivno	negativno				
38.	06.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:1024+-	pozitivno	pozitivno				
39.	07.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
40.	09.08.2013.	negativno	pozitivno	1:128+	pozitivno	negativno				
41.	09.08.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
42.	09.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	07.08.
43.	09.08.2013.	negativno	pozitivno	1:256+	pozitivno	negativno				
44.	09.05.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	08.08.
45.	12.08.2013.	negativno	pozitivno	1:256+, 1:512+-	pozitivno	negativno				

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
46.	12.08.2013.	negativno	pozitivno	1:256+	pozitivno	negativno				
47.	12.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	02.08.
48.	12.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	pozitivno	pozitivno	10.08.
49.	13.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:32+	pozitivno	pozitivno				
50.	13.08.2013.	pozitivno	negativno		negativno	negativno				
51.	13.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
52.	13.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:16+	negativno	negativno				
53.	14.08.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
54.	14.08.2013.	negativno	pozitivno	1:64+, 1:128+-	pozitivno	negativno				
55.	14.08.2013.	negativno	pozitivno	1:256+, 1:512 +-	pozitivno	negativno				
56.	15.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno				
57.	15.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:64+, 1:128+-	pozitivno	negativno				
58.	16.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
59.	16.08.2013.	negativno	pozitivno	1:128+, 1:512+-	pozitivno	negativno				
60.	16.08.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
61.	19.08.2013.	negativno	pozitivno	1:128+	pozitivno	negativno				
62.	19.08.2013.	negativno	pozitivno	1:16+	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno	17.08.
63.	19.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
64.	19.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno				
65.	19.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	16.08.
66.	20.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	19.08.
67.	20.08.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno	NT	NT	pozitivno	19.08.
68.	21.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				AGID + serum
69.	21.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	16.08. AGID - serum
70.	21.08.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
71.	21.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	sumnjivo				
72.	22.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno				
73.	23.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
74.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	pozitivno				
75.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	20.08.
76.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	krpeljski meningnecefalis+
77.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	negativno	pozitivno	25.08.
78.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno				
79.	26.08.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
80.	27.08.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
81.	29.08.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	28.08.
82.	29.08.2013.	negativno	pozitivno	1:256+, 1:512+-	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	28.08.
83.	02.09.2013.	pozitivno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	negativno				
84.	02.09.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
85.	02.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	01.09.
86.	02.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	02.09.
87.	03.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	02.09.
88.	03.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	02.09.
89.	03.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	03.09.
90.	03.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	31.08.
91.	05.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
92.	05.09.2013.	pozitivno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
93.	06.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
94.	06.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
95.	09.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
96.	09.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno	pozitivno	09.09.
97.	10.09.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				

Red. br.	Datum prijema materijala	Rezultat AGID Test	IFA „in house“	TITRACIJA IFA „in house“	IFA komercijalno dostupan test 1:10	ELISA IgG „in house“	ELISA serum IgM	ELISA serum IgG	ELISA CSF IgM	Napomena
98.	11.09.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64+-	negativno	negativno				
99.	11.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
100.	11.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048++	pozitivno	negativno				
101.	11.09.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, :64+-	pozitivno	negativno				
102.	13.09.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
103.	16.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno				
104.	19.09.2013.	negativno	pozitivno	1:16+	pozitivno	negativno				
105.	23.09.2013.	negativno	pozitivno	1:2048+	pozitivno	sumnjivo	pozitivno	negativno	negativno	20.09.
106.	23.09.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				AGID –serum
107.	24.09.2013.	negativno	pozitivno	1:256+-	negativno	negativno				
108.	25.09.2013.	negativno	pozitivno	1:1024+	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	24.09.
109.	26.09.2013.	negativno	pozitivno	1:16+, 1:64+-	negativno	negativno				
110.	07.10.2013.	negativno	negativno		negativno	negativno				
111.	09.10.2013.	negativno	negativno		pozitivno	negativno				
112.	11.10.2013.				pozitivno	negativno				

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije testirano

PRILOG 2

Uporedni prikaz rezultata dijagnostičkih testova na krvnim serumima konja po godinama.

Uzorci krvnih seruma konja iz 2011. godine.

Tabela 1. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za *WNV* u krvnim serumima konja uzorkovanih tokom 2011. godine

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
1.	04.11.2011 Požarevac Hipodrom	negativno	negativno		NT	sumnjivo	Negativno
2.	04.11.2011 Požarevac Hipodrom	negativno	negativno		NT	pozitivno	Negativno
3.	04.11.2011 Požarevac Hipodrom	negativno	negativno		NT	negativno	Negativno
4.	04.11.2011 Požarevac Hipodrom	negativno	negativno		NT	negativno	Negativno
5.	04.11.2011 Požarevac Hipodrom	negativno	negativno		NT	negativno	Negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
6.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
7.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		NT	pozitivno	Negativno
8.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
9.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		pozitivno	negativno	Pozitivno
10.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		pozitivno	negativno	Negativno
11.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
12.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
13.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
14.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	Negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
15.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	Pozitivno
16.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	pozitivno	Negativno
17.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
18.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
19.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
20.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	Negativno
21.	11.06.2011. Beograd Hipodrom	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	Negativno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije testirano

Uzorci krvnih seruma konja iz 2012. godine.

Tabela 2. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za WNV u krvnim serumima konja uzorkovanih tokom 2012. godine

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titir	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
1.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	Negativno
2.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	Negativno
3.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	Negativno
4.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Pozitivno	pozitivno	1:512	pozitivno	pozitivno	Negativno
5.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		sumnjivo	negativno	negativno
6.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
7.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
8.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
9.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		pozitivno	negativno	pozitivno
10.	30.03.2012. Požarevac Hipodrom	Negativno	negativno		sumnjivo	negativno	negativno
11.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
12.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
13.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
14.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
15.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
16.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
17.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
18.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
19.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	pozitivno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
20.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno
21.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
22.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
23.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
24.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		pozitivno	negativno	negativno
25.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
26.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
27.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
28.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
29.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
30.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
31.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
32.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Pozitivno	pozitivno	1:512	pozitivno	pozitivno	negativno
33.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
34.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
35.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
36.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
37.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
38.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
39.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	negativno		pozitivno	negativno	negativno
40.	16.10.2012. Šabac Hipodrom	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
41.	08.10.2012. Subotica	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
42.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno
43.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno
44.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:128	pozitivno	pozitivno	negativno
45.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:256	pozitivno	pozitivno	pozitivno
46.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:128	pozitivno	pozitivno	negativno
47.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
48.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno
49.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
50.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	pozitivno
51.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
52.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:256	pozitivno	negativno	pozitivno
53.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
54.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
55.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
56.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
57.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
58.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
59.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
60.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
61.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titlar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
62.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
63.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
64.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
65.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
66.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
67.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
68.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
69.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
70.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
71.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
72.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
73.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
74.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
75.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
76.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	pozitivno	pozitivno
77.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
78.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
79.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
80.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
81.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
82.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	pozitivno	pozitivno
83.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
84.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
85.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	negativno	negativno
86.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
87.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
88.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
89.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
90.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
91.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	negativno	pozitivno
92.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
93.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
94.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:128	pozitivno	negativno	negativno
95.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
96.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
97.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
98.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
99.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
100.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
101.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:32	sumnjivo	pozitivno	negativno
102.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	sumnjivo	negativno	negativno
103.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
104.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno
105.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
106.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
107.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	pozitivno	negativno
108.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	pozitivno	negativno
109.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	pozitivno	pozitivno
110.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno
111.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
112.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
113.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
114.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
115.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
116.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
117.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	sumnjivo	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
118.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno
119.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	sumnjivo	negativno	negativno
120.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:1024	pozitivno	pozitivno	negativno
121.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
122.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno
123.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
124.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:1024	pozitivno	pozitivno	negativno
125.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:1024	pozitivno	pozitivno	negativno
126.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:2048	pozitivno	pozitivno	negativno
127.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
128.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
129.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	negativno
130.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:16	negativno	pozitivno	negativno
131.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:32	pozitivno	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
132.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	pozitivno	1:32	negativno	pozitivno	negativno
133.	29.08.2012 konji Beograd	Pozitivno	pozitivno	1:128	pozitivno	pozitivno	pozitivno
134.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
135.	29.08.2012 konji Beograd	Negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno
136.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
137.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	negativno	negativno
138.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
139.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	pozitivno	negativno
140.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
141.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	pozitivno	negativno
142.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	pozitivno	negativno
143.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	sumnjivo	negativno
144.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:256	NT	pozitivno	pozitivno
145.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
146.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
147.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:128	NT	pozitivno	pozitivno
148.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
149.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	sumnjivo	negativno
150.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
151.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	pozitivno	negativno
152.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	sumnjivo	sumnjivo
153.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
154.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
155.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	NT	pozitivno
156.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
157.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
158.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	negativno	pozitivno
159.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	pozitivno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
160.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	pozitivno	negativno
161.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
162.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	pozitivno
163.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
164.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	pozitivno	negativno
165.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	negativno	negativno
166.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
167.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	NT	negativno
168.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
169.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
170.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
171.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
172.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
173.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	pozitivno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
174.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:256	NT	pozitivno	negativno
175.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	pozitivno	negativno
176.	03.07.2012.	Pozitivno	pozitivno	1:512	NT	pozitivno	negativno
177.	03.07.2012.	Pozitivno	pozitivno	1:512	NT	pozitivno	negativno
178.	03.07.2012.	Pozitivno	pozitivno	1:256	NT	pozitivno	negativno
179.	03.07.2012.	Pozitivno	pozitivno	1:128	NT	pozitivno	pozitivno
180.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
181.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:16	NT	negativno	negativno
182.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	negativno	negativno
183.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
184.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
185.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
186.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	negativno	negativno
187.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno

Broj uzorka	Lokacija	AGID	IFA in house	Titar	IFA komercijalna	ELISA in house	ELISA komercijalna
188.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
189.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
190.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
191.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
192.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	negativno	pozitivno
193.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
194.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:64	NT	negativno	pozitivno
195.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	negativno	negativno
196.	03.07.2012.	Negativno	negativno		NT	pozitivno	negativno
197.	03.07.2012.	Negativno	pozitivno	1:128	NT	negativno	negativno

Legenda: pozitívno- pozitívno rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT -nije testirano

Uzorci krvnih seruma konja iz 2013. godine

Tabela 3. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za *WNV* u krvnim serumima konja uzorkovanih tokom 2013. godine

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
1.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	pozitivno
2.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
3.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
4.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
5.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
6.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
7.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	pozitivno

8.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		sumnjivo	negativno	negativno
9.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
10.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
11.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
12.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	NT
13.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
14.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
15.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
16.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	negativno	pozitivno
17.	16.08.2013. Stara Planina Gornji Krivodol	negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
18.	28.06.2013. Pančevo	negativno	pozitivno	1:256	pozitivno	pozitivno	pozitivno
19.	28.06.2013. Pančevo	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
20.	28.06.2013. Pančevo	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
21.	28.06.2013. Pančevo	negativno	pozitivno	1:256	pozitivno	pozitivno	pozitivno
22.	28.06.2013. Pančevo	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
23.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
24.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	pozitivno
25.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
26.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
27.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
28.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
29.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
30.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	pozitivno	negativno
31.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
32.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
33.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
34.	19.06.2013. Lekovac Hipodrom Hisar	negativno	negativno		pozitivno	sumnjivo	negativno
35.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:1024	pozitivno	negativno	pozitivno
36.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:512	pozitivno	negativno	pozitivno
37.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	negativno	pozitivno
38.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
39.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	negativno		pozitivno	negativno	pozitivno
40.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
41.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
42.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	NT
43.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	negativno
44.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
45.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	negativno		NT	negativno	negativno
46.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:64	negativno	negativno	pozitivno
47.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
48.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
49.	23.05.2013.Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:256	pozitivno	negativno	pozitivno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
50.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
51.	23.05.2013. Banatski Karlovac	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	negativno
52.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
53.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	negativno	pozitivno
54.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	pozitivno
55.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	negativno
56.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	negativno	negativno
57.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	negativno		sumnjivo	negativno	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
58.	29.05.2013. Novi Sad	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
59.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	negativno		pozitivno	pozitivno	negativno
60.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:64	pozitivno	pozitivno	pozitivno
61.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	negativno		negativno	pozitivno	negativno
62.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:128	pozitivno	negativno	pozitivno
63.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:16	negativno	pozitivno	negativno
64.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:64	negativno	negativno	pozitivno
65.	29.05.2013. Zornatica Bačka Topola	negativno	negativno		negativno	sumnjivo	negativno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
66.	29.05.2013. Zobnatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	pozitivno	pozitivno
67.	29.05.2013. Zobnatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	negativno
68.	29.05.2013. Zobnatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:128	pozitivno	pozitivno	negativno
69.	29.05.2013. Zobnatica Bačka Topola	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
70.	29.05.2013. Zobnatica Bačka Topola	negativno	pozitivno	1:512	pozitivno	pozitivno	pozitivno
71.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
72.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	pozitivno
73.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:32	negativno	negativno	pozitivno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
74.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	pozitivno
75.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
76.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
77.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	negativno	negativno	pozitivno
78.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
79.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:32	pozitivno	negativno	pozitivno
80.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
81.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno

Redni broj na lokaciji	Datum uzorkovanja i lokacija	AGID	IFA "in house"	TITAR	IFA komercijalna	ELISA "in house"	ELISA komercijalna
82.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	negativno		negativno	negativno	negativno
83.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
84.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno
85.	11.03.2013. Sremska Mitrovica KPZ	negativno	pozitivno	1:16	pozitivno	negativno	pozitivno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +/-, NT -nije testirano

PRILOG 3

Uporedni prikaz rezultata dijagnostičkih testova na krvnim serumima pasa po godinama

Uzorci krvnih seruma pasa iz 2011. godine

Tabela 1. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za *WNV* u krvnim serumima pasa uzorkovanih tokom 2011. godine

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
1.	Beograd	381	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
2.	Beograd	385	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
3.	Beograd	386	negativno	NT	NT	negativno	negativno
4.	Beograd	387	negativno	NT	NT	negativno	negativno
5.	Beograd	390	negativno	NT	NT	negativno	negativno
6.	Beograd	393	negativno	NT	NT	negativno	negativno
7.	Beograd	407	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
8.	Beograd	412	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
9.	Beograd	415	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
10.	Beograd	444	negativno	NT	NT	negativno	negativno
11.	Beograd	446	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
12.	Beograd	436	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
13.	Beograd	431	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
14.	Beograd	429	negativno	NT	NT	sumnjivo	negativno
15.	Beograd	425	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
16.	Beograd	424	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
17.	Beograd	420	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
18.	Beograd	418	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
19.	Ub	6	negativno	NT	NT	negativno	negativno
20.	Ub	14	negativno	NT	NT	negativno	negativno
21.	Ub	17	negativno	NT	NT	negativno	negativno
22.	Ub	22	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
23.	Ub	26	negativno	NT	NT	Sumnjivo	negativno
24.	Ub	28	negativno	NT	NT	negativno	negativno
25.	Ub	29	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
26	Ub	33	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
27.	Ub	34	negativno	NT	NT	negativno	negativno
28.	Ub	39	negativno	NT	NT	negativno	negativno
29.	Ub	41	negativno	NT	NT	negativno	negativno
30.	Ub	42	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije dobijeni specifični rezultati

Uzorci krvnih seruma pasa iz 2012. godine

Tabela 2. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za *WNV* u krvnim serumima pasa uzorkovanih tokom 2012. godine

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
1.	Beograd	447	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
2.	Beograd	449	negativno	NT	NT	negativno	negativno
3.	Beograd	453	negativno	NT	NT	negativno	negativno
4.	Beograd	457	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
5.	Beograd	459	negativno	NT	NT	negativno	negativno
6.	Beograd	461	negativno	NT	NT	negativno	negativno
7.	Bujanovac	2	negativno	NT	NT	negativno	negativno
8.	Bujanovac	4	negativno	NT	NT	negativno	negativno
9.	Bujanovac	9	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
10.	Bujanovac	13	negativno	NT	NT	negativno	negativno
11.	Bujanovac	18	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
12.	Bujanovac	22	negativno	NT	NT	negativno	negativno
13.	Bujanovac	25	negativno	NT	NT	negativno	negativno
14.	Bujanovac	28	negativno	NT	NT	negativno	negativno
15.	Bujanovac	32	negativno	NT	NT	negativno	negativno
16.	Bujanovac	35	negativno	NT	NT	negativno	negativno
17.	Bujanovac	38	negativno	NT	NT	negativno	negativno
18.	Bujanovac	44	negativno	NT	NT	negativno	negativno
19.	Bujanovac	47	negativno	NT	NT	negativno	negativno
20.	Bujanovac	50	negativno	NT	NT	negativno	negativno
21.	Bujanovac	51	negativno	NT	NT	negativno	negativno
22.	Bujanovac	55	negativno	NT	NT	negativno	negativno
23.	Bujanovac	58	negativno	NT	NT	negativno	negativno
24.	Bujanovac	63	negativno	NT	NT	negativno	negativno
25.	Bujanovac	66	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
26.	Bujanovac	73	negativno	NT	NT	negativno	negativno
27.	Loznica	1	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
28.	Loznica	4	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
29.	Loznica	10	negativno	NT	NT	negativno	negativno
30.	Loznica	13	negativno	NT	NT	negativno	negativno
31.	Loznica	15	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
32.	Loznica	16	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
33.	Loznica	18	negativno	NT	NT	negativno	negativno
34.	Loznica	30	negativno	NT	NT	negativno	negativno
35.	Loznica	34	negativno	NT	NT	negativno	negativno
36.	Loznica	36	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
37.	Loznica	43	negativno	NT	NT	negativno	negativno
38.	Loznica	49	negativno	NT	NT	negativno	negativno
39.	Loznica	50	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
40.	Loznica	51	negativno	NT	NT	negativno	negativno
41.	Loznica	52	negativno	NT	NT	negativno	negativno
42.	Loznica	57	negativno	NT	NT	negativno	negativno
43.	Loznica	60	negativno	NT	NT	negativno	negativno
44.	Loznica	63	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
45.	Loznica	68	negativno	NT	NT	negativno	negativno
46.	Loznica	70	negativno	NT	NT	negativno	negativno
47.	Požarevac	30	negativno	NT	NT	negativno	negativno
48.	Požarevac	31	negativno	NT	NT	negativno	negativno
49.	Požarevac	32	negativno	NT	NT	negativno	negativno
50.	Požarevac	36	negativno	NT	NT	Sumnjivo	negativno
51.	Požarevac	38	negativno	NT	NT	negativno	negativno
52.	Požarevac	40	negativno	NT	NT	negativno	negativno
53.	Požarevac	41	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
54.	Požarevac	42	negativno	NT	NT	negativno	negativno
55.	Vršac	2	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
56.	Vršac	6	negativno	NT	NT	negativno	negativno
57.	Vršac	11	negativno	NT	NT	negativno	negativno
58.	Vršac	16	negativno	NT	NT	negativno	negativno
59.	Vršac	19	negativno	NT	NT	negativno	negativno
60.	Vršac	24	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
61.	Vršac	25	negativno	NT	NT	negativno	negativno
62.	Vršac	27	negativno	NT	NT	negativno	negativno
63.	Vršac	29	negativno	NT	NT	negativno	negativno
64.	Vršac	33	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
65.	Vršac	36	negativno	NT	NT	negativno	negativno
66.	Vršac	40	negativno	NT	NT	negativno	negativno
67.	Vršac	42	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
68.	Vršac	43	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
69.	Vršac	45	negativno	NT	NT	negativno	negativno
70.	Vršac	44	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
71.	Vršac	46	negativno	NT	NT	negativno	negativno
72.	Vršac	47	negativno	NT	NT	negativno	negativno
73.	Vršac	37	negativno	NT	NT	negativno	negativno
74.	Vršac	34	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije dobijeni specifični rezultati

Uzorci krvnih seruma pasa iz 2013. godine

Tabela 3. Uporedni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela za *WNV* u krvnim serumima pasa uzorkovanih tokom 2013. godine

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
1.	Sremska Mitrovica	1	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
2.	Sremska Mitrovica	4	negativno	NT	NT	negativno	negativno
3.	Sremska Mitrovica	7	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
4.	Sremska Mitrovica	10	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
5.	Sremska Mitrovica	22	negativno	NT	NT	negativno	negativno
6.	Sremska Mitrovica	25	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
7.	Sremska Mitrovica	27	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
8.	Sremska Mitrovica	33	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
9.	Sremska Mitrovica	37	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
10.	Sremska Mitrovica	40	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
11.	Sremska Mitrovica	42	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
12.	Sremska Mitrovica	46	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
13.	Sremska Mitrovica	52	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
14.	Sremska Mitrovica	58	negativno	NT	NT	negativno	negativno
15.	Sremska Mitrovica	60	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
16.	Sremska Mitrovica	75	negativno	NT	NT	negativno	negativno
17.	Sremska Mitrovica	80	negativno	NT	NT	negativno	negativno
18.	Sremska Mitrovica	87	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
19.	Sremska Mitrovica	88	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
20.	Sremska Mitrovica	90	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
21.	Leskovac	1	negativno	NT	NT	negativno	negativno
22.	Leskovac	2	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
23.	Leskovac	4	negativno	NT	NT	negativno	negativno
24.	Leskovac	8	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
25.	Leskovac	11	negativno	NT	NT	negativno	negativno
26.	Leskovac	13	negativno	NT	NT	negativno	negativno
27.	Leskovac	17	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
28.	Leskovac	18	negativno	NT	NT	negativno	negativno
29.	Leskovac	22	negativno	NT	NT	negativno	negativno
30.	Leskovac	25	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
31.	Leskovac	27	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
32.	Leskovac	30	negativno	NT	NT	negativno	negativno
33.	Leskovac	32	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
34.	Leskovac	34	negativno	NT	NT	negativno	negativno
35.	Leskovac	38	negativno	NT	NT	negativno	negativno
36.	Leskovac	40	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
37.	Leskovac	41	negativno	NT	NT	negativno	negativno
38.	Leskovac	44	negativno	NT	NT	negativno	negativno
39.	Leskovac	45	negativno	NT	NT	negativno	negativno
40.	Leskovac	50	negativno	NT	NT	pozitivno	Sumnjivo
41.	Šabac	1	negativno	NT	NT	negativno	negativno
42.	Šabac	2	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
43.	Šabac	3	negativno	NT	NT	negativno	negativno
44.	Šabac	4	negativno	NT	NT	negativno	negativno
45.	Šabac	5	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
46.	Šabac	6	negativno	NT	NT	Sumnjivo	pozitivno
47.	Šabac	7	negativno	NT	NT	Sumnjivo	pozitivno
48.	Šabac	8	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
49.	Šabac	9	negativno	NT	NT	negativno	negativno
50.	Šabac	10	negativno	NT	NT	negativno	negativno
51.	Šabac	11	negativno	NT	NT	pozitivno	negativno
52.	Šabac	12	negativno	NT	NT	negativno	negativno
53.	Šabac	13	negativno	NT	NT	negativno	negativno
54.	Šabac	14	negativno	NT	NT	negativno	negativno
55.	Šabac	15	negativno	NT	NT	negativno	negativno
56.	Šabac	16	negativno	NT	NT	negativno	negativno
57.	Šabac	17	negativno	NT	NT	negativno	negativno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
58.	Šabac	18	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
59.	Šabac	19	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
60.	Šabac	20	negativno	NT	NT	negativno	negativno
61.	Pančevo	2	negativno	NT	NT	negativno	negativno
62.	Pančevo	3	negativno	NT	NT	negativno	negativno
63.	Pančevo	8	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
64.	Pančevo	10	negativno	NT	NT	Sumnjivo	pozitivno
65.	Pančevo	13	negativno	NT	NT	Sumnjivo	pozitivno
66.	Pančevo	16	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
67.	Pančevo	20	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
68.	Pančevo	25	negativno	NT	NT	negativno	negativno
69.	Pančevo	29	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
70.	Pančevo	31	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
71.	Pančevo	33	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
72.	Pančevo	34	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno

Redni broj	Lokalitet	Broj uzoraka krvnih seruma pasa	AGID	IFA „in house“ IgG	IFA komercijalna IgG	ELISA „in house“	Elisa Komercijalna Anti prE
73.	Pančevo	37	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
74.	Pančevo	39	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
75.	Pančevo	40	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
76.	Pančevo	42	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
77.	Pančevo	43	negativno	NT	NT	pozitivno	pozitivno
78.	Pančevo	44	negativno	NT	NT	negativno	negativno
79.	Pančevo	45	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno
80.	Pančevo	46	negativno	NT	NT	negativno	pozitivno

Legenda: pozitivno- pozitivan rezultat testa, negativno- negativan rezultat testa, sumnjivo +-, NT –nije dobijeni specifični rezultati

BIOGRAFIJA

Dipl.vet. Ana Vasić rođ. Samokovlija je rođena 03.06.1982.g. u Beogradu, Republika Srbija.

Osnovnu školu „Vojvoda Radomir Putnik“ (1989-1997) završila je u Beogradu sa odličnim uspehom kao nosilac Vukove diplome. Paralelno pohađa Školu za osnovno muzičko obrazovanje „Josif Marinković“ pa „Josip Slavenski“ u Beogradu sa glavnim predmetom violina. Treću beogradsku gimnaziju (1997-2001) završava sa odličnim uspehom, a pohađa i Srednju muzičku školu „Josip Slavenski“. Fakultet veterinarske medicine upisuje 2001. godine, a diplomira 19.09.2008.godine sa prosečnom ocenom 8,72 (osam i 72/100). U toku osnovnih studija 2006. godine boravi tri meseca (mart-jun) na Facolta di Medicina Veterinaria, Alma mater studiorum, Universita di Bologna, Italy kao nosilac stipendije TEMPUS projekta gde se upoznaje sa radom klinika ovog fakulteta uključujući i Departman za infektivne bolesti životinja i dobija preporuku sa pohvalom (Br.Pos III/10, Prot. No 260). Doktorske studije na Fakultetu veterinarske medicine upisala je 2008. godine. U toku doktorskih studija položila je sve ispite (17) sa prosečnom ocenom 9.26. Dana 08.07.2014. godine Veće Univerziteta u Beogradu je prihvatilo temu i odobrilo izradu doktorske disertacije pod nazivom „Uporedna analiza seroloških metoda u dijagnostici infekcije virusom zapadnog Nila“.

Aktivno volontira (2005-2007) u Prijemnoj ambulanti Katedre za bolesti kopitara i mesojeda Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Pripravnički staž je obavila na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu i položila Državni stručni ispit (Uverenje br. 152-02-00006/2012-05). Nosilac je licence Veterinarske komore br. 3174. Član je Srpskog veterinarskog društva. Od februara 2009. godine do 01.01.2011. godine angažovana je na Projektu TR 21047 „Istraživanje ekofaune na lokalitetu Obedska bara u odnosu na pojavu naročito opasnih zaraznih bolesti ljudi i životinja virusne etiologije“ Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije kao istraživač-doktorant i nosilac Stipendije Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja, a na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Od januara 2011. godine do danas angažovana je u zvanju istraživača pripravnika, a potom u zvanju istraživača saradnika na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR 37015 i TR 31088.

Govori aktivno: engleski jezik (diploma FCE University of Cambridge, No 006EA0010057), italijanski jezik (diploma CELI 4, Università per stranieri di Perugia, No 10072736), kao i francuski jezik. Odlično vlada radom na računaru. Posедуje vozačku dozvolu B kategorije.

U okviru stručnog usavršavanja 2010. godine pohađa i završava kurs Srpskog veterinarskog društva i RSPCA International pod nazivom "Dobrobit životinja-crveno meso". Tokom 2011. godine pohađa i završava kurs organizaciji FAO/IAEA Workshop on classical and molecular veterinary diagnostics, Vienna 28.11.-09.12.2011. godine, kada dobija stipendiju (travel grant) Evropskog udruženja za veterinarsku virusologiju (European Society for Veterinary Virology). Tokom 2012. godine pohađa obuku iz molekularnih metoda dijagnostike virusnih bolesti životinja u Naučnom institutu za veterinarstvo Novi Sad. Tokom 2016. godine boravi dva meseca na Vetsuisse Faculty-University of Zurich, Institute for Parasitology u okviru Scopus projekta- vektorska entomologija. Završila kurs ishrane konja Univerziteta u Edinburgu, kao i kurs vakcinologije Univerziteta u Pensilvaniji.

Aktivno je učestvovala u organizaciji nacionalnih i međunarodnih skupova (Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja, Godišnje savetovanje veterinaru Srbije i Internacionalni epizootiološki dani) u zemlji kao član Sekretarijata. Tokom osnovnih i doktorskih studija aktivan je učesnik brojnih skupova nacionalnog i međunarodnog značaja gde je objavila preko 30 naučnih radova kao prvi autor i koautor.

Do sada je objavila (kao autor i koautor) pet radova kategorije M51, jedan rad kategorije M24 i četiri rada kategorije M23 i jedan rad kategorije M22.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана М. Васић

број уписа 15/9

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**Упоредна анализа серолошких метода у дијагностици инфекције вирусом
Западног Нила**

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.01.2016.

Ана Васић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана М. Васић

Број уписа 15/9

Студијски програм Докторске студије ветеринарске медицине

Наслов рада Упоредна анализа серолошких метода у дијагностици инфекције
вирусом Западног Нила

Ментор Проф.др Мирослав Валчић

Потписани Ана М.Васић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.01.2016.г.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Упоредна анализа серолошких метода у дијагностици инфекције вирусом Западног Нила

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.01.2016.г.

Alice Vancic'