

**SEROEPIZOOTIOLOŠKA ISPITIVANJA ŽIVOTINJA SA  
LOKALTETA OBEDSKA BARA NA PRISUSTVO VIRUSA  
INFLUENCE PTICA\***

*SEROEPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF ANIMALS  
FROM OBEDSKA BARA LOCALITY FOR PRESENCE OF  
AVIAN INFLUENZA VIRUS*

**Bosiljka Đuričić, Ana Samokovlija, Živka Ilić, D. Bacić, Sonja Radojičić,  
Ana Gligić\*\***

*Bolest izazvana influenza virusima poznata je od davnina. U no-  
vije vreme, javljale su se pandemije izazvane influenza A-virusima sa vi-  
sokom stopom smrtnosti. Sadašnja pandemija avijarne influence po-  
javila se u Hongkongu 1992. godine sa serotipom H<sub>9</sub>N<sub>9</sub>, a sa H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>  
počela je 1997. godine u Kini (Hongkong). Globalizaciju ove pan-  
demije učinile su migracione ptice. Pojava bolesti registrovana je i u  
našoj zemlji 2007. godine.*

*Cilj rada je bio da se ispita prisustvo virusa influence ptica tipa A  
kod životinja na lokalitetu Obedska bara, poznatom rezervatu brojnih  
ptica u Srbiji, kao i odmorištu ptica koje migriraju iz Evrope u Afriku i obr-  
nuto. Reakcijom inhibicije hemaglutinacije (HI test) ispitivani su uzorci  
krvnih seruma raznih životinja (123 uzorka pernate živine, 64 seruma  
magaraca i 40 seruma konja) na prisustvo antitela za influencu A – pod-  
tipovi H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>. Takođe su ispitivani i uzorci se-  
ruma eksperimentalnih pilića izloženih kontaktu sa divljom prirodom  
(sentinel jedinke) na području Obedske bare. Specifična antitela za  
podtipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> utvrđena su kod pilića u se-  
lima Deč, Boljevci, Petrovčić i Kupinovo, dok u serumima kokošaka  
poreklom iz Dobanovaca, Jakova, Bečmena i Surčina antitela nisu  
nađena. Od 23 uzorka krvnog seruma pataka, specifična antitela su*

\* Rad primljen za štampu 18. 05. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Bosiljka Đuričić, redovni profesor, Ana Samokovlija, dr vet. med., doktorant, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Srbija; mr sci. med. vet. Živka Ilić, istraživač saradnik, Naučni institut za vetri- narstvo Srbije "Beograd", Beograd; dr sci. med. vet. Dragan Bacić, asistent, dr sci. med. vet. Sonja Radojičić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Srbija; dr sci. med Ana Gligić, viši naučni saradnik u penziji, Beograd, Srbija

utvrđena kod 3 uzorka i u 4 od 22 uzorka seruma gusaka. Od 40 ispitivanih uzoraka krvnih seruma konja antitela su ustanovljena u jednom uzorku, dok je u uzorcima seruma magaraca prisustvo specifičnih antitela utvrđeno u 17 od 64 ispitivanih uzorka. U serumima eksperimentalnih pilića antitela su nađena za podtip virusa influence  $H_5N_1$  sa koreakcijama sa antigenima podtipova  $H_5N_2$  i  $H_7N_1$ .

*Ključne reči: Influenca ptica, Obedska bara, HI test*

## Uvod / Introduction

Influenca je visokokontagiozna, akutna virusna bolest ljudi i većeg broja vrsta životinja. Ekonomske štete koje prouzrokuje svojom pojavom u zdravlju i stočarstvu su znatne.

Uzročnik bolesti je influenza virus tipa A. Istorijski podaci vezani za ovu bolest ukazuju na to da je influenza poznata od davnina. Prvi opisi bolesti potiču od Hipokrata, iz 412. godine pre nove ere (Acha i Szyfres, 1987). U srednjem veku (1500-1800. g.) opisane su brojne epidemije sa visokim letalitetom (Wright i Webster, 2001). U novije vreme, naročito razvojem brzih saobraćajnih komunikacija među kontinentima, došlo je do pojave epidemija influence koje su poprimale razmere pandemija. Tako je u prošlom veku najpoznatija pandemija poznata kao „španska groznica“ (1918.) odnela više od 40 miliona života (Wright i Webster, 2001). Uzročnik je bio virus influence tipa A –  $H_1N_1$ . Zatim se javila pandemija 1957. godine (azijski grip), prouzrokovana virusom influence tipa A –  $H_2N_2$ , a 1968. godine virus A –  $H_3N_2$  (Hongkong), dok je pandemija 1977. godine bila prouzrokovana virusom influence A –  $H_3N_1$  (Ruski soj) (Alexander i Brown, 2000).

Danas se zna da svi poznati sojevi virusa influence A kod ljudi i životinja pripadaju porodici *Orthomyxoviridae* i rodu *Influenzavirus* koji obuhvata viruse tipa A, B i C. Prvi izolat virusa influence potiče od svinja (1930. god.), a prvi humani influenza virus izolovan je 1933. godine, kasnije nazvan influenza A. Tokom 40-ih i 50-ih godina 20. veka izolovani su sojevi influence tipa B i C. Virus tipa A izaziva infekciju kod ljudi, svinja, konja, foka, domaće živine i brojnih vrsta divljih ptica. Klinička slika kod inficiranih je teška i često letalna, kako za čoveka tako i za mnoge životinje. Kod nekih vrsta životinja (preživari, foke i tuljani, psi, kune i dr.) infekcija influenza A virusima obično prolazi inaparanentno, iako je potvrđeno da su tokom 1979. i 1982. virusi  $H_7N_7$  i  $H_4N_5$  izazvali veliki pomor tuljana u jednom zalivu u SAD (Lang i sar., 1981; Stuart-Harris i sar., 1985). Tip B izaziva blažu infekciju kod ljudi, dok tip C, pored blage respiratorne infekcije kod ljudi, može da izazove infekciju i kod svinja.

Podela virusa influence na tipove izvršena je na osnovu razlika u strukturi nukleoproteina i strukturnog M-proteina. Tako se genom virusa – segmentirana jednolančana RNK, kod tipova A i B sastoji iz 8 segmenata, za razliku od in-

fluence tipa C, koji poseduje 7 segmenata. Na osnovu subtipskih specifičnih antigena virusa influence – hemaglutinina (H) i neuraminidaze (N), mogu se danas razlikovati subtipovi sojeva sa 16 različitih hemaglutinina (H<sub>1</sub>-H<sub>16</sub>) i 9 neuraminidaza (N<sub>1</sub>-N<sub>9</sub>). Kada se hemaglutinin i neuraminidaza posmatraju sa antigene strane, kao snažni antigeni podložni su varijacijama, naročito hemaglutinin. To ima za posledicu stvaranje novih podtipova virusa influence od kojih neki izazivaju infekcije razmera epidemija i pandemija. Ove antigenske promene nastaju na više načina, čemu posebno pogoduje segmentirana građa genoma. Zato su moguće velike unakrsne promene usled razmene segmenata između različitih vrsta – genetski reasortiman ili „shift“ (čovjek, svinja, ptica), ili dolazi do promena manjih razmera koje se godinama akumuliraju u jednom serotipu pod uticajem spoljašnjih faktora – „drift“ (klima, radijacije, hrana, voda i drugo). Ove promene se retko dešavaju kod virusa influence tipa B i C ali su dosta česte kod virusa influence tipa A (Alexander, 2006; Hay i sar., 2001; Lamb i Krug, 2001; Wright i Webster, 2001).

U epizootologiji influence danas je poznato da su vodene ptice prirodni rezervoari svih influenci virusa tipa A. Isto tako ptice selice imaju veliki značaj u širenju ptičje influence što se desilo sa subtipom virusa H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, koji je iz Kine prenesen na celu Aziju i u Evropu. Kada je u pitanju zoonozni karakter avijarne influence sve do 1997. se mislilo da se ptičji virusi ne mogu preneti na humanu populaciju. Te godine visoko patogeni kokošji (ptičji) virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> izazvao je pomor pilića na 3 farme (70-100%), a zatim se pojavio kod ljudi sa letalitetom oko 30% (Claas i sar. 2006; Shortridge i sar., 1998; Yuen i sar., 1998). Molekularnim metodama virusološke dijagnostike dokazana je povezanost ptičje influence H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> sa pojavom oboljenja kod ljudi (Bender i sar., 1999). To je bio prvi opis direktnog prenosa virusa influence sa ptica na čoveka. Ovaj slučaj je rezultirao time da je na farmama u okolini Hongkonga ubijeno preko 2 miliona pilića. Tokom 1999. zabeležena je i infekcija dece ptičjim virusom A-H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (Guan i sar, 1999; Peiris i sar., 1999). Kada su druge vrste ptica u pitanju i prisustvo virusa influence, prvi virulentni soj ptičjeg virusa H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> izolovan je iz divljih gusaka 1996. u Kini (Alexander, 2006), a domaće patke su imale glavnu ulogu u širenju virusa u epidemijama tokom 2003. i 2004. (De Jong i Hien, 2006; Sims i sar., 2005). Posle toga je zabeleženo desetak epidemija izazvanih virusima influence tipa H<sub>5</sub> i H<sub>7</sub>, koji su neprestano prisutni u populacijama divljih ptica (Swaine, 2006; Tweed i sar., 2004). Prva pojava visokopatogenog ptičijeg virusa H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> u Srbiji je registrovana tokom 2007. kod uginulog labuda u Bačkom Monoštoru (Petrović, 2007). Iste godine oboljenje je registrovano i u susednoj republici Hrvatskoj, kada je virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> izolovan iz nekoliko crvenokljunih labudova, divljih pataka i rečnih galebova (Savić i sar., 2005), kao i republikama Sloveniji i Bosni i Hercegovini.

### **Cilj istraživanja / Objective of Investigations**

Na osnovu poznatih epizootiološko-epidemioloških podataka o širenju i prisustvu influenza virusa kod vodenih i migracionih vrsta ptica ukazala se potreba da se ispita da li su virusi influence ptica tipa A prisutni u populaciji životinja na lokalitetu Obedska bara, poznatom rezervatu brojnih vrsta ptica u Srbiji, što je i bio cilj naših istraživanja. S obzirom na to da pomenuti lokalitet predstavlja i odmorište većeg broja migracionih ptica koje se iz Evrope sele u toplije krajeve i Afriku i obrnuto, iz Afrike u Evropu, pretpostavka je da bi virusi influence ptica tipa A trebalo da budu prisutni i u populaciji životinja sa ovog područja.

### **Materijal i metode rada / Material and methods**

**Serumi / Serums:** Reakcijom inhibicije hemaglutinacije (HI) ispitivani su uzorci krvnih seruma različitih vrsta životinja sa istraživanog područja na prisustvo specifičnih antitela za nekoliko podtipova influence ptica. Ispitivanjima su obuhvaćena 123 uzorka seruma pernate živine, 64 uzorka seruma magaraca i 40 seruma konja. Pored krvnih seruma odrasle živine, ispitivani su i krvni serumi od 30 „sentinel“ pilića koji su bili postavljeni na lokalitetu Obedska bara i podeljeni u 2 grupe koje su ostavljene na obodu bare u selima Kupinovo i Obrež. Pilići su u prirodi bili izloženi kontaktu sa drugim pticama (divlje ptice) koje su dolazile na hranu i na taj način ostvarivale kontakt sa eksperimentalnim pilićima. Od eksperimentalnih pilića uzimana je krv 7. i 14. dana od početka ogleada radi otkrivanja prisustva specifičnih antitela za virus ptičje influence tipa A.

Svi uzorci seruma su pre rada inaktivisani na 56°C u trajanju od 30 minuta. Serumi su zatim razređivani (1:10 i 1:20 i više) za dalja serološka ispitivanja i do rada čuvani na -18°C. Kontrolni imuni serumi dobijeni su uz specifične antigene iz Hrvatske (Veterinarski institut, Zagreb, Dr V. Savić) u liofilizovanom stanju pod sledećim oznakama: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>-A/Cygnus olor/Croatia/1/2005 (lot: S-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>/12/07); H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>A/mallard/Croatia/1/2005 (lot: s-H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>-A/chicken/Italy/1067/1999 (lot: S H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>/12/97).

**Antigeni / Antigens:** Svi korišćeni antigeni za serološka ispitivanja kao i kontrolni pozitivni serumi potiču iz Centra za peradarstvo Veterinarskog instituta iz Zagreba, Hrvatska (dr V. Savić). Dobijeni su u liofilizovanom stanju pod sledećim oznakama: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>-R5371/Croatia (lot: A-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>/o5/o8); H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>-A(turkey/Italy/1980:lot: H5N2/12/07); H5N3-A/mallard /Croatia/1/o6 (lot: A-H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>/05/08); H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>-A/chicken/Italy/1067/1999(lot:A-H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>/12/06) i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>-A/Av-7152/Croatia/2007(lot.A H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>/04/08).

Kao materijal za rad korišćeni su kokošji eritrociti u Alsever rastvoru, a zatim ispirani 3 puta u fiziološkom rastvoru (FR) posle čega je pravljena 1% suspenzija eritrocita za izvođenje reakcije hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije (HA i HI).

**Izvođenje reakcije inhibicije hemaglutinacije (HI) / *Haemagglutination inhibition (HI) reaction test:*** Pre izvođenja svake reakcije, određivan je hemaglutinacioni titar virusa metodom hemaglutinacije u mikrotitracionim pločama uz pravljenje razblaženja antigena od 1:4 do 1:2048. Posle određivanja hemaglutinacionog titra virusa, pripremana su radna razređenja virusa sa fiziološkim rastvorom od 4 hemaglutinacione jedinice (4 HJ) radi izvođenja standardnog testa inhibicije hemaglutinacije. Reakcija je izvođena tako što je u sva udubljena mikroploča sipano po 0,025 ml FR. Posle toga je izvođena titracija uzoraka seruma od po 0,025 ml a zatim je dodato po 0,025 ml antigena sa 4 jedinice hemaglutinina. Mešavini serum-antigen je posle perioda inkubacije od 30 minuta dodavano po 0,025 ml 1% kokošnjih eritrocita, koji su služili kao indikator reakcije antigena i antitela. Pri svakom izvođenju reakcije rađene su kontrole jedinica hemaglutinacionog antigena, eritrocita i pozitivnog kontrolnog seruma. Poslednje razblaženje seruma, koje je inhibiralo 4 jedinice hemaglutinacionog antigena označeno je kao titar antitela seruma, odnosno pozitivni nalaz.

#### Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Rezultati izvršenih seroloških ispitivanja uzorkovanih krvnih seruma ptica, magaraca i konja na prisustvo specifičnih antitela protiv visoko virulentnih sojeva virusa influence ptica tipa A dobijeni primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI) prikazani su u tabelama od 1-4.

Sumarni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma raznih vrsta živine za 5 subtipova virusa avijarne influence A sakupljenih na lokalitetu Obedska bara prikazani su u tabeli 1. Antitela za subtipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> nađena su kod pilića u selima Deč, Boljevci, Petrovčić i Kupinovo, dok u serumima kokošaka iz Dobanovaca, Jakova, Bečmena i Surčina antitela nisu ustanovljena.

Tabela 1. *Nalaz antitela kod živine na 5 subtipova virusa avijarne influence A / Table 1. Findings of antibodies to 5 subtypes of avian influenza type A in fowl*

Lokalitet / <i>Locality</i>	Broj i vrsta / <i>Number and species</i>	H <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>3</sub>	H <sub>7</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>
Dobanovci	19 kokošaka / <i>19 hens</i>	0/19	0/19	0/19	/	/
Dobanovci	2 pauna / <i>2 peacock</i>	0/2	0/2	/	/	/
Jakovo	10 kokošaka / <i>10 hens</i>	0/10	0/10	0/10	/	/
Bečmen	20 kokošaka / <i>20 hens</i>	0/20	0/20	/	/	/
Surčin	15 kokošaka / <i>15 hens</i>	0/15	0/15	/	/	/

nastavak tabele 1. / cont. Table 1.

Deč	10 pataka / 10 ducks	1/10	0/10	2/10	/	/
Boljevci	9 gusaka / 9 geese	1/9	1/9	0/9	/	/
Petrovčić	11 pataka / 11 ducks	1/11	0/11	0/11	/	/
Kupinovo	12 pilića / 12 chicks	0/12	0/12	/	4/12	/
Kupinovo	2 patke / 2 ducks	1/2	/	/	/	1/20
Kupinovo	13 gusaka / 13 geese	1/13	/	/	/	2/13
Ukupno / Total	123	5/123	1/108	2/59	4/12	3/23

Nalaz specifičnih antitela u krvnim serumima konja sa ispitivanog područja prikazan je u tabeli br. 2. Dobijeni rezultati pokazuju da je pozitivan nalaz registrovan samo u jednom uzorku i to za serotip H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virusa influence. Nalaz specifičnih antitela u 64 uzorka ispitivanih krvnih seruma magaraca sa lokaliteta Zasavica, ukazuje na to da je bilo pozitivno 17 seruma i to na serotipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> virusa avijarne influence.

Tabela 2. Serološki nalaz specifičnih antitela za virus influence A u serumima konja i magaraca /

Table 2. Serological findings of specific antibodies to influenza virus type A in serums of horses and donkeys

Lokaliteti / Locality	Vrsta i broj / Number and species	H <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>
Zasavica	64 magarca / 64 donkeys	17/64	NT	1/64	3/64
Obedska bara	40 konja / 40 horses	1/40	NT	1/40	1/40

Rezultati seroloških ispitivanja 30 krvnih seruma sentinel pilića za 3 serotipa virusa ptičje influence prikazani su u tabeli 3.

Virusi influence tipa A izazivaju infekciju kod ljudi, svinja, konja, foka, domaće živine i brojnih vrsta divljih ptica. Rezervoari virusa influence A u prirodi su vodene ptice, najčešće patke, obalske ptice i galebovi. Ptice mogu biti inficirane sa većim brojem subtipova virusa A koji u sebi mogu da sadrže različite kombinacije svih 16 hemaglutinina i 9 neuraminidaza. Zbog segmentiranog genoma i brojnih mogućih kombinacija hemaglutinina i neuraminidaza, kod virusa influence je najizraženija antigenska promenljivost, što za posledicu ima pojavu novih subtipova, opasnih kako za humanu tako i za animalnu populaciju. Prema prijemčivosti na infekciju sa ptičjim i virusima influence sisara, svinje i ljudi pokazuju

podjednaku osetljivost. Takođe je poznato da ptičji influenza virus može da pre-skoči barijeru vrste i izazove pojavu naročito opasne bolesti sa visokim letalitetom kod ljudi. Do sada je pojava prelaska barijere vrste avijarnih subtipova virusa influ-ence imala ograničenu sposobnost daljeg širenja sa čoveka na čoveka.

Tabela 3. Nalaz specifičnih antitela u serumima eksperimentalnih (sentinel) pilića /  
Table 3. Findings of specific antibodies in serums of experimental (sentinel) chicks

Lokalitet / Locality	Broj / Number	H <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	H <sub>7</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> i H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> i H <sub>7</sub> N <sub>1</sub>	+ na 3 antigena / + to 3 antigens (H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> , H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> , H <sub>7</sub> N <sub>1</sub> )
Kupinovo 7. dan / Kupinovo 7 days	20	3/20	7/20	10/20	3/20	6/20	3/20
Obrež 7. dan / Obrež 7 days	10	0/10	3/10	4/10	0/10	3/10	0/10
Kupinovo 14. dan / Kupinovo 14 days	18	9/18	5/18	18/18 *	0/18	2/18	4/18
Obrež 14. dan / Obrež 14 days	10	3/10	2/10	8/10	1/10	1/10	1/10

\*pilići su bili sa znacima respiratorne infekcije / \*chicks had signs of respiratory infection

Pojava epizootija i epidemija influence A poslednjih godina u svetu sve je češće rezultat direktnog ili indirektnog kontakta prijemčive domaće živine sa migracionim pticama. Do sada, su pojave visoko patogene ptičje influence bile prouzrokovane subtipovima H<sub>5</sub> i H<sub>7</sub>, koji su iz niske virulence posle nekoliko pasaža mutirali u visokopatogeni virus. U humanoj populaciji, od stotine poznatih sojeva ptičje influence, pouzdano se zna da infekciju mogu izazvati 4 i to: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>; H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>; H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> i H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (Mohan i sar., 2008). Prvi slučajevi obolevanja ljudi od visoko-patogene influence ptica H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> zabeleženi su u Hongkongu 1997. god., sa letalite-tom 70-100% (Claas i sar., 2006; Shortridge i sar., 1998). U cilju sprečavanja širenja i iskorenjivanja bolesti tada je ubijeno 1.500.000 pilića u Hongkongu. Tokom 1999. god. ptičji virus H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> izolovan je iz materijala obolelih u Hongkongu (Peiris i sar., 1999), a infekcije ovim subtipom su dokazane i u Italiji, Nemačkoj, Izraelu, Južnoj Africi, Iranu, Koreji, Saudijskoj Arabiji, Pakistanu i Kini (Alexander i Gough, 1997; Halvorson i sar., 1998). Takođe, H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> ptičji virus, izolovan je kod obolele osobe u Engleskoj (Kurtz i sar., 1996).

Nalaz specifičnih antitela za virus ptičje influence subtip H<sub>5</sub> i H<sub>7</sub> u seru-mima domaće živine sa područja Obedska bara (tabela 1 i tabela 3) jasno ukazuje na potencijalnu opasnost da se i na ovom lokalitetu, kao i na drugim mestima u svetu, gde živi na hiljade ptica i gde se odmaraju brojna migraciona jata, bez učešća čoveka, mogu javiti novi opasni subtipovi virusa influence A.

Rezultati ispitivanja dobijeni kod eksperimentalno praćenih pilića (sentinel grupa) pokazivali su jasno uočljivu korelaciju između pozitivnih nalaza antitela u zavisnosti od vremena ekspozicije i mogućeg kontakta pilića sa divljim

pticama. Tako su 7. dana oglada u grupi od 20 pilića iz sela Kupinovo ustanovljena antitela za  $H_5N_1$  virus kod 3 uzorka (15%), a za  $H_7N_1$  u 50% uzoraka seruma. Kod 10 pilića iz sela Obrež, antitela za  $H_5N_1$  nisu nađena, dok je za  $H_7N_1$  taj procenat bio 40% (tabela 3). Posle 14. dana, u Kupinovu taj procenat je za  $H_5N_1$  iznosio 50, a za  $H_7N_1$  100%. U Obrežu, 30% pilića imalo je antitela za  $H_5N_1$  i 80% pilića za  $H_7N_1$  (tabele 3 i 4). Eksperimentalni pilići su 14. dana pokazivali znake respiratorne infekcije.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja imunološkog odgovora kod sentinel pilića /  
Table 4. Results of investigations of immunological response in sentinel chicks

	$H_5N_1$	$H_7N_1$
<b>7 dan / 7 days</b>		
Kupinovo	15%	50%
Obrež	0	40%
<b>14 dan / 14 days</b>		
Kupinovo	50%	100%
Obrež	30%	80%

Serološki rezultati kod magaraca sa lokaliteta u Zasavici, koji su godinama izloženi kontaktima sa divljim pticama, pokazali su da 26,5% životinja poseduje antitela za  $H_5N_1$  virusni antigen, dok 4,7% magaraca poseduje istovremeno antitela i za  $H_5N_1$  i  $H_7N_2$  subtipove ptičje influence (tabela 2). Taj procenat kod konja iznosi 2,5%, kako za influencu  $H_5N_1$  tako i za  $H_7N_2$  (tabela 2).

#### Zaključak / Conclusion

Dobijeni rezultati ukazuju na to da su podtipovi  $H_5$  i  $H_7$  ptičjeg virusa influence A prisutni na području Obedske bare. Sve ovo ukazuje na potrebu daljih istraživanja vezanih za otkrivanje prisustva virusa influence ptica tipa A kod životinja i ljudi na istraživanom lokalitetu. Prioritet predstavlja dalje istraživanje na izolaciji virusa, kao i ispitivanje uzoraka seruma živine, divljih ptica i drugih vrsta prijemčivih životinja na prisustvo specifičnih antitela za druge podtipove influenza virusa.

#### NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad finansiran sa projekta TP 21047 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R Srbije.

#### Literatura / References

1. Acha PN, Szyfres. ZOONOSES and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Second ed. Pan american health Organization, Washington, 1987; 365-76.



2. Alexander DJ, Gough RE. Virus diseases of the respiratory organs: world situation and recent developments. In proc. 11th International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Acta Vet Hung 1997; 45 (Suppl): 1-22.
3. Alexander DJ, Brown IH. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev Sci Tech, Off Int Epiz 2000; 19(1): 197-225.
4. Alexander DJ. Avian influenza viruses and human health. Dev Biol (Basel) 2006; 124: 77-86.
5. Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, Gregory V, Cameron K, Lim W, Subbarao K. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. Virology 1999; 254: 115-23.
6. Claas ECJ, Osterhaus ADME, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Seene DA, Kraus S, Shortridge KF, Webster RG. Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. 1998. Lancet 2006; 351: 472-7.
7. De Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). J Clin Virol 2006; 35(1): 2-13.
8. Guan Y, Shortridge KF, Kraus S, Webster RG. Molecular characterization of H9 N2 influenza viruses: were they the donors of the „internal“ genes of H5N1 viruses in Hong Kong? Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 9363-7.
9. Halvorson DA, Frame DD, Frienshuh AJ, Shaw DP. Outbreaks of lowpathogenicity avian influenza in USA,. In Proc. 4th International Symposium on avian influenza. 28-31 May 1997., Athens, Georgia. American Association of Avian Oathologists, Pensilvania 1998; 36-46.
10. Hay AJ, Gregory AV, DYP Lin. The evolution of human influenza viruses, Philos Trans R Soc London B Biol Sci 2001; 356(1416): 1861-70.
11. Kurtz J., Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. Lancet 1996; 348: 901-2.
12. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae and Their Replication, In: Knipe DM, Howley PM et al.: Fields Virology, 4th ed., Lippincot-Williams-Wilkins, Philadelphia 2001; 1487-532.
13. Lang G, Gagnon A, Geraci JR. Isolation of an influenza A virus from seals. Arch Virol 1981; 68: 189-95.
14. Mohan M, Francis FT, Feroz MMS. Avian influenza infection in human. Vet World 2008; 1(4): 122-5.
15. Peiris M, Yam YC, Chan KH, Ghose P, Shortridge KF. Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 3426-7.
16. Petrović T (lično saopštenje). Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, 2007.
17. Savić V, Labrović A, Amšel Zelenika T, Balenović M, Šeparović S, Jurinović L. Unos i širenje visokopatogene influence (H5N1) divljim pticama u Hrvatskoj tijekom 2005 i 2006. Banja Junaković. Zbornik radova i kratkih sažetaka simpozijuma XI epizootiološki dani od 1-4 Aprila, 2009; 136-45.
18. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti GK, Norwood M, Senne DA, Sims L, Takada A, Webster RG. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology 1998; 252: 331-42.
19. Sims LD, Domenech J, Benigno C *et al.* Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. Vet Resc 2005;157(6): 159-64.
20. Stuart-Harris CH, Schild GC, Oxford JS. Infuenca in animals and birds. In Influenza: the viruses and the disease, 2nd Ed. Edward Arnold Ltd, Baltimore, Maryland, 1985; 83-102.

21. Swaine DE. Occupational and consumer risks from avian influenza viruses. Dev Biol (Basel) 2006; 124: 85-9.
22. Tweed SA, Skowronski DM, David ST *et al.* Human illness from avian H7N3. British Columbia, Emerg Infect Dis 2004; 10(12): 119-22.
23. Wright FR, Webster RB. Orthomyxoviruses, In: Knipe DM, Howley *et al.*: Field Virology, 4th ed., Lipincot-Williams-Wilkins, Philadelphia, 2001; 1533-80.
24. Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AFB. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71.

ENGLISH

**SEROEPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF ANIMALS FROM OBEDSKA BARA LOCALITY FOR PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS**

**Bosiljka Đuričić, Ana Samokovlija, Živka Ilić, D. Bacić, Sonja Radojčić, Ana Gligić**

The disease caused by Influenza viruses has been well known for a very long time. In the recent period there has been noted an occurrence of pandemics caused by Influenza viruses type A with a high rate of mortality. The ongoing pandemic caused by avian influenza virus serotype  $H_9N_9$  began in Hong Kong in 1992, and another pandemic caused by serotype  $H_5N_1$  began in China (Hong Kong) in 1999. The world wide spreading of these viruses occurred due to migratory birds. Avian influenza was confirmed in Serbia in 2007.

The goal of this study was to examine whether the avian influenza viruses type A circulate in the region of the Obedska bara marsh, which is a famous resort for many birds in Serbia, as well as many birds migrating from Europe to Africa and vice versa. The samples of blood sera of many animal species (123 samples from fowl, 64 samples from donkeys, 40 samples from horses) were tested by serologic reaction of inhibition of haemagglutination (IHA) for the presence of antibodies to influenza A subtypes H5N1,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  and  $H_7N_2$ . Also, the samples of blood sera of experimental chicken exposed to wild life in Obedska bara (sentinel species) were tested. Antibodies to subtypes  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  and  $H_7N_2$  were found in chicken from Dec, Boljevci, Petrovcic and Kupinovo villages but no antibodies were found in blood sera from hams from Dobanovci, Jakovo, Becmen and Surcin villages. From 23 samples from ducks antibodies were detected in 3 samples, and from 22 geese blood sera antibodies were found in 4 samples. From a total of 40 horse blood sera tested one was tested positive, and from 64 donkey sera 17 were positive for the presence of antibodies for avian influenza type A. In blood sera of experimental chicken antibodies were found by subtype  $H_5N_1$  with corrections with  $H_5N_2$  and  $H_7N_1$ .

Key words: Avian influenza, Obedska bara marsh, IHA

**СЕРОЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ЖИВОТНЫХ С МЕСТА ОБЕДСКА БАРА НА ПРИСУТСТВИЕ ВИРУСА ИНФЛЮЭНЦЫ ПТИЦ**

**Босилька Джуричич, Анна Самоковлия, Живка Илич, Д. Бацич,  
Соня Радоичич, Анна Глигич**

Болезнь вызвана инфлюэнца вирусами известна с древности. В более новое время, являются пандемии, вызванные инфлюэнца А вирусами с высокой ставкой смертности. Теперешняя пандемия птичьей инфлюэнцы появилась в Гонконге 1992 года с серотипом  $H_9N_9$ , а с  $H_5N_1$  начала 1997 года в Китае (Гонког). Глобализацию этой пандемии сделали миграционные птицы. Явление болезни зарегистрировано и в нашей стране 2007 года.

Цель работы была испытать присутствие вируса инфлюэнцы птиц типа А у животных на месте Обедска бара, известном резервате численных птиц в Сербии, словно и месту отдыха птиц, мигрирующие из Европы в Африку и наоборот. Реакцией торможения гемагглютинации (ГТ тест) испытываны образчики кровяных серумов разных животных (123 образчика пернатых домашних птиц, 64 серума ослов и 40 серумов лошадей) на присутствие антител для инфлюэнцы А-подтипы  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  и  $H_7N_2$ . Также испытываны и образчики серуме экспериментальны цыплят, подвергнутых контакту с дикой природой (сентинел отдельные животные) на подведомственной области Обредской бары. Специфические антитела для подтипов  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  и  $H_7N_2$  утверждены у цыплят в деревнях Деч, Болевцы, Петровчич и Купиново, пока в серумах кур происхождением из Добановаца, Якова, Бечмена и Сурчина антитела не найдены. Из 23 образчика кровяного серума уток, специфические антитела утверждены у 3 образчика и в 4 из 22 образчика серума гусей. Из 40 испытыванных образчиков кровяных серумов лошадей антитела установлены в одном образчике, пока в образчиках серума остлов присутствие специфических антител утверждено в 17 и 64 испытыванных образчика. В серумах экспериментальных цыплят антитела найдены для подтипа вируса инфлюэнцы  $H_5N_1$  с коррекциями с антигенами подтипов  $H_5N_2$  и  $H_7N_1$ .

Ключевые слова: инфлюэнца птиц, Обедска бара, ГТ тест