

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

Aleksandar V. Živulj

ISPITIVANJE POTENCIJALNIH
SENTINEL VRSTA ŽIVOTINJA U
NADZORU GROZNICE ZAPADNOG
NILA

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF INFECTIOUS ANIMALS DISEASES
AND DISEASES OF BEES**

Aleksandar V. Živulj

**INVESTIGATION OF POTENTIAL
SENTINEL SPECIES FOR THE WEST
NILE FEVER SURVEILLANCE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI:

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Tamaš Petrović, naučni savetnik

Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Jakov Nišavić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Vesna Milićević, naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Dr Sandra Šipetić Grujičić, redovni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Beograd

Zahvaljujem se Mentorima Prof dr Sonji Radojičić i Dr Tamašu Petroviću na uloženom trudu, od samih ideja kojima je ova doktorska disertacija započeta, preko svih pomoći u realizaciji zacrtanog cilja.

Zahvaljujem se članovima komisije na savetima i predlozima u izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se kolegi Slavoljubu Stanojeviću oko nesebične pomoći pri statističkoj obradi dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se kolegama iz VSI Pančevo, koji su pomogli u izradi ove doktorske disertacije.

Velika zahvalnost svim mojim kolegama i prijateljima koji su pomogli u raznim poslovima oko izrade ove doktorske disertacije.

Velika zahvalnost za moju porodicu, koja je bila uz mene sve vreme, od početka mog školovanja, do dana današnjeg i bila moj oslonac u svim trenucima!

ISPITIVANJE POTENCIJALNIH SENTINEL VRSTA ŽIVOTINJA U NADZORU GROZNICE ZAPADNOG NILA

REZIME

Virus Zapadnog Nila pripada familiji *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* i izaziva groznicu Zapadnog Nila. Virus Zapadnog Nila je prvi put identifikovan 1937. godine u Ugandi, oblast West Nile, u uzorku krvi žene koja je ispoljila kliničke simptome povišene telesne temperature.

Virus Zapadnog Nila se prenosi i održava u prirodi u ciklusu komarac – ptica gde su ptice rezervoari virusa i prirodni domaćini. Konji i ljudi su slučajni domaćini virusa, mogu klinički oboleti ali nemaju titar virusa u krvi koji bi inficirao komarce. Oko 25% obolelih ljudi ispoljava povišenu telesnu temperaturu, a manje od 1% obolelih ljudi ispoljava neurološke poremećaje. Kod konja dolazi do ispoljavanja simptoma oboljenja nervnog sistema a u nekim slučajevima i do uginuća.

Pojava serokonverzije izazvane virusom Zapadnog Nila je utvrđena kod konja, ljudi, kokoši, goveda, pasa, svinja, magaraca, koza, ptica poput golubova, vrabaca i drugih domaćih i divljih životinja. Osnovni zadatak sprovođenja programa nadzora groznice Zapadnog Nila jeste pravovremeno otkrivanje prisustva i cirkulacije virusa na nekom području, kao i određivanje početka sezonske cirkulacije virusa u enzootskim područjima u cilju blagovremenog informisanja, kontrole vektora i preveniranja infekcije ljudi i životinja i sprečavanja pojave epidemija i epizootija.

Cilj ispitivanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita svrsishodnost postojećeg programa nadzora virusa Zapadnog Nila kao sistema ranog upozoravanja („*early warning system*“) i utvrdi prostorna i vremenska korelacija nalaza proisteklih iz postojećeg sistema monitoringa u odnosu na pojavu bolesti kod ljudi, kao i da se ispita mogućnost korišćenja goveda, svinja i živine kao sentinel vrsta životinja za efektivniji nadzor groznice Zapadnog Nila.

Ukupno je ispitano 140 zbirnih uzoraka komaraca, 319 uzoraka krvnog seruma konja, 76 uzoraka poreklom od divljih ptica (faringealni brisevi, mozak i druga tkiva), 168 uzoraka krvnog seruma goveda, 124 uzoraka krvnog seruma svinja i 125 uzoraka krvnog seruma živine. Prikupljanje uzoraka vršeno je u periodu 2017.-2019. godina, na više lokaliteta u više opština Južnobanatskog okruga u Republici Srbiji.

Ispitivanjem 140 zbirnih uzoraka komaraca metodom *real time* RT-PCR utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila kod 22 uzorka (15,7%), s tim da postoji značajna razlika u broju pozitivnih slučajeva u 2018. godini (15) u odnosu na 2017. godinu (7). Test odnosa šansi pokazuje da je šansa otkrivanja pozitivnih uzorka u 2018. godini bila 2,8 puta veća u odnosu na 2017. godinu. Ispitivanjem 319 uzoraka krvnog seruma konja utvrđeno je prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod dva konja (0,6%), po jedan u 2017. i 2018. godini. Od 76 ispitanih uzoraka poreklom od divljih ptica metodom *real time* RT-PCR utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila kod jedne divlje ptice – siva vrana (1,3%). Ispitivanjem 105 uzoraka krvnog seruma goveda utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 48 goveda (45,6%), od kojih je najviša seroprevalencija od 66,7% na farmi u naseljenom mestu Starčevo, na farmi u Mramorku 46,7%, a na farmi u Pančevu 35%. Ispitivanjem 33 uzoraka krvnog seruma

teladi starih 2-3 meseca utvrđena su maternalna specifična antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod dva teleta, dok u starosti teladi od 4-5 meseci nisu utvrđena specifična antitela. Od 124 ispitanih uzoraka krvnog seruma svinja kod 27 uzoraka utvrđena su specifična antitela protiv virusa zapadnog Nila. Veći broj serološki pozitivnih svinja poticao je sa individualnog sektora – 22 životinje, čime je odbačena nulta hipoteza da tip proizvodnje ne utiče na broj inficiranih životinja i potvrđena alternativa hipoteza da broj inficiranih životinja zavisi od načina proizvodnje. Ispitivanjem 125 uzoraka krvnog seruma živine utvrđena su specifična antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 22 uzorka (17,6%), koja su sva poticala iz individualnih gazdinstva (38,8%), dok su svi uzorci sa farmi reagovali negativno. Uočena je visoka statistička značajnost razlika u rezultatima seroprevalencije koja je uslovljena načinom držanja živine, pa se kod živine držane u ekstenzivnim uslovima, infekcija virusom Zapadnog Nila značajno češće javlja.

Prostorno vremenskim analizama epizootije groznice Zapadnog Nila i analizom slučajeva infekcije kod životinja 2018. godine, utvrđeno je da su se slučajevi infekcije grupisali shodno određenim obrascima uslovljenim faktorima rizika. Primenom Moranovog I testa globalne autokorelacije, dokazana je relevantnost atributa na nivou čitavog istraživanog geografskog područja, dok su lokalnom autokorelacijom određena mesta gde se grupišu slučajevi infekcije odnosno serokonverzije. Uočeno je da zone sa povećanim rizikom od infekcije obuhvataju područja koja su bogata stajaćim i tekućim vodama u širem području Grada Pančeva i da se pružaju dužinom reka Dunav i Tamiš, uzvodno i nizvodno, pa je u tom smislu indikovano ove oblasti držati pod stalnim nadzorom. Utvrđivanje ovih tačaka ima značaj u utvrđivanju daljih mera, kako u samom nadzoru groznice Zapadnog Nila, tako i u kontroli vektora, što kao krajnji efekat treba da dovede do preveniranja pojave bolesti kod ljudi i životinja.

Ključne reči: virus Zapadnog Nila, nadzor, sentinel životinje, komarci, domaće i divlje životinje

Naučna oblast: Veterinarska medicina

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

UDK broj: 636.093:616.928.8

INVESTIGATION OF POTENTIAL SENTINEL SPECIES FOR THE WEST NILE FEVER SURVEILLANCE

SUMMARY

West Nile virus belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, and causes West Nile fever. West Nile virus was first identified in 1937 in Uganda, West Nile region, in a blood sample of a woman who was presented with clinical symptoms of fever.

West Nile virus is transmitted and maintained in nature in the mosquito-bird cycle, where birds are reservoirs and natural hosts of the virus. Horses and humans are “dead-end” hosts of the virus; they can be clinically ill but do not have a titer of the virus in their blood that would infect mosquitoes. About 25% of infected people show fever, and less than 1% show neurological disorders. In horses, the symptoms of the nervous system disease are manifested, and in some cases with fatal outcome.

The appearance of seroconversion caused by West Nile virus has been seen in the horses, humans, chicken, cattle, dogs, pigs, donkeys, goats, birds such as pigeons and sparrows, and other domestic and wild animals. The main task of the West Nile fever surveillance program is to detect presence and circulation of the virus in the area, as well as to recognize the beginning of seasonal circulation of the virus in enzootic areas in order to provide timely information, control of vectors and to prevent human and animal infections, epidemics and epizootics.

The aim of the present doctoral dissertation was to examine the effectiveness of the existing West Nile virus surveillance program as an early warning system and to determine the spatial and temporal correlation of the findings from the existing monitoring system in relation to the occurrence of the disease in humans, as well as to examine the possibility of using cattle, pigs and poultry as sentinel species for more effective surveillance of West Nile fever.

A total of 140 pooled samples of mosquitoes, 319 blood serum samples from horses, 76 samples from wild birds (pharyngeal swabs, brain and other tissues), 168 bovine blood serum samples, 124 pig blood serum samples, and 125 poultry blood serum samples were examined. The samples were collected in the period from 2017 to 2019, at several sites and municipalities of the South Banat District in the Republic of Serbia.

Examination of 140 pooled samples of mosquitoes by real-time RT-PCR revealed the presence of West Nile virus nucleic acid in 22 samples (15.7%), with a significant difference in the number of positive cases in 2018 (15) compared to 2017 (7). Odds ratio test shows that the chance of detecting positive samples in 2018 was 2.8 times higher than in 2017. Examination of 319 blood serum samples from horses showed the presence of IgM antibodies against West Nile virus in two horses (0.6%), one in 2017 and one in 2018. Out of 76 examined samples originating from wild birds by real-time RT-PCR, the presence of West Nile virus nucleic acid was determined in one wild bird - grey crow (1.3%). Examination of 105 blood serum samples from cattle revealed the presence of specific antibodies against West Nile virus in 48 animals (45.6%), with the highest seroprevalence (66.7%) on the farm in Starčevo, followed by the seroprevalence of 46.7% on the farm in Mramorak and 35% on the farm in Pančevo. Examination of 33 blood serum samples from two to three-month-old calves revealed

maternal specific antibodies against West Nile virus in two calves, while no specific antibodies were found in calves aged 4 to 5 months. Out of 124 blood serum samples from pigs, specific antibodies against West Nile virus were detected in 27 samples. A larger number of serologically positive pigs originated from the individual holdings - 22 animals, which rejected the null hypothesis that the type of production does not affect the number of infected animals and confirmed the alternative hypothesis that the number of infected animals depends on the method of production. Examination of 125 blood serum samples from poultry revealed specific antibodies against West Nile virus in 22 samples (17.6%), all of which came from individual holdings (38.8%), while all samples from farms reacted negatively. Statistically highly significant difference in results of seroprevalence was observed, and it is conditioned by the way that poultry are kept, thus in poultry kept in extensive conditions, West Nile virus infection occurs significantly more often.

Spatial-temporal analyzes of the West Nile fever epizootic and analysis of cases of infection in animals in 2018 showed that cases of infection were grouped according to certain patterns conditioned by risk factors. By applying Moran's I test of global spatial autocorrelation, the relevance of attributes at the level of the entire researched geographical area was proven, while local autocorrelation determined the places where cases of infection or seroconversion are grouped. It was noted that the zone with increased risk of infections includes areas rich in standing and running waters in the wider area of the City of Pančevo and extends along the Danube and Tamiš rivers, upstream and downstream, thus, in that sense, it is indicated to keep these areas under constant surveillance. Determining these points is important for establishing further measures, both in the control of West Nile fever and in vector control, which as an end effect should lead to prevention of disease in humans and animals.

Key words: West Nile virus, surveillance, sentinel animals, mosquitoes, domestic and wild animals

Scientific area: Veterinary medicine

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

UDK: 636.093:616.928.8

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Istorijat groznice Zapadnog Nila, biološke osobine virusa i patogeneza	3
2.2. Klinička slika kod ljudi, životinja i prevencija.....	5
2.2.1. Klinička slika kod ljudi	5
2.2.2. Klinička slika kod životinja.....	6
2.2.3. Prevencija.....	6
2.3. Laboratorijska dijagnostika Groznice Zapadnog Nila.....	6
2.4. Epizootiologija i monitoring virusa Zapadnog Nila; Sentinel vrste.....	8
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	22
4. MATERIJAL I METODE.....	23
4.1. MATERIJAL.....	23
4.1.1. Uzorci komaraca, organa divljih ptica i krvnog seruma.....	23
4.1.2. Izveštaji Zavoda za javno zdravlje Pančevo po pitanju groznice Zapadnog Nila kod ljudi	24
4.1.3. Dijagnostičko sredstvo za izvođenje metode ELISA	24
4.1.4. Materijal za izvođenje metode <i>real-time</i> RT-PCR.....	25
4.2. METODE RADA.....	26
4.2.1. ELISA	26
4.2.1.1. Principi i postupak izvođenja ELISA INGEZIM West Nile IgM	27
4.2.1.2. Principi, postupak izvođenja ELISA INGEZIM West Nile Compac kao i izračunavanje karakteristika testa.....	27
4.2.2. <i>Real time</i> RT-PCR.....	29
4.2.2.1. Principi i postupak izolacije-ekstrakcije RNK	29
4.2.2.2. Principi i postupak izvođenja <i>real-time</i> RT-PCR reakcije	30
4.2.3. Statistička obrada podataka.....	31
4.2.3.1. Procena rizika	31
4.2.3.2. Prostorno-vremenska analiza epizootije Groznice Zapadnog Nila	31
4.2.3.2.1. Analiza gustine klastera.....	31
4.2.3.2.2. <i>Hot spot</i> analiza klastera.....	32
4.2.3.2.3. Inkrementalna prostorna autokorelacija	32

4.2.3.3. Vremenska, prostorna i prostorno-vremenska analiza klastera	33
5. REZULTATI ISPITIVANJA	34
5.1. Rezultati ispitivanja uzoraka komaraca na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila	34
5.1.1. Monitoring 2017. godine	34
5.1.2. Monitoring 2018. godine	36
5.1.3. Rezultati statističke ocene značajnosti razlika u broju registrovanih slučajeva prisustva groznice Zapadnog Nila u ispitivanim grupnim uzorcima komaraca tokom 2017. i 2018. godine u Južnobanatskom okrugu	40
5.2. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila	41
5.2.1. Monitoring u 2017. godini	41
5.2.2. Monitoring u 2018. godini	45
5.3. Rezultati ispitivanja uzoraka tkiva i briseva poreklom od divljih ptica na prisustvo delova genoma virusa Zapadnog Nila	49
5.3.1. Monitoring 2017. godine	49
5.3.2. Monitoring 2018. godina	50
5.4. Ispitivanje prisustva infekcije/serokonverzije izazvane virusom Zapadnog Nila kod domaćih životinja	54
5.4.1. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma goveda	54
5.4.1.1. Uzorci krvnih seruma teladi, junica i krava – Farma “Vojvodina” u Starčevu, opština Pančevo	55
5.4.1.2. Uzorci krvnog seruma teladi, junica i krava – Farma „Stari Tamiš” u Pančevu	59
5.4.1.3. Uzorci krvnog seruma teladi, junica i krava – Farma „Zlatar”, Mramorak, opština Kovin	66
5.4.1.4. Rezultati ispitivanja prisustva maternalnih antitela u serumu teladi sa farmi u Starčevu, Starom Tamišu i Mramorku	70
5.4.2. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma svinja	70
5.4.2.1. Uzorci krvnog seruma svinja – svinje sa farmi	71
5.4.2.2. Uzorci krvnog seruma svinja – individualna gazdinstva	71
5.4.3. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma živine	74
5.4.3.1. Uzorci krvnog seruma živine – živina sa farmi	74
5.4.3.2. Uzorci krvnog seruma živine – individualna gazdinstva	76
5.5. Epidemiološki izveštaji Zavoda za javno zdravlje Pančevo po pitanju groznice Zapadnog Nila kod ljudi	78
5.6. Deskriptivna analiza epizootioloških indikatora infekcije virusom Zapadnog Nila	81

5.7. Deskriptivna analiza epidemioloških indikatora groznice Zapadnog Nila na ispitivanom području.....	83
5.8. Izbor potencijalnih sentinel vrsta - rezultati ekološke studije posmatranja linearne povezanosti faktora izloženosti i broja seropozitivnih životinja na virus Zapadnog Nila.....	85
5.8.1. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „vrsta domaće životinje/tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije/serokonverzije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja	85
5.8.2. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod svinja uzgajanih na farmama i seoskim gazdinstvima	88
5.8.3. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod živine držane na farmama i seoskim gazdinstvima	91
5.8.4. Rezultati procene faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila primenom Bajesove mreže (vrsta, starosta i tip proizvodnje)	95
5.9. Rezultat geoprostorne analize grupisanja klastera	99
5.9.1. Kartografski prikaz distribucije frekvencija slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila.....	99
5.9.2. Analiza gustine klastera	106
5.9.3. Hot spot analiza klastera	109
6. DISKUSIJA.....	128
7. ZAKLJUČCI.....	136
8. LITERATURA.....	138

1. UVOD

Virus Zapadnog Nila pripada familiji *Flaviviridae* i rodu *Flavivirus*. Pripada RNK virusima jer poseduje jednolančani linearni, pozitivno orijentisan molekul RNK. Izaziva groznicu Zapadnog Nila kod konja, ptica i ljudi. Rezervoari pomenutog virusa u prirodi su ptice (migratorne divlje ptice), neke vrste komaraca, a zabeleženi su i slučajevi sporadičnog prisustva virusa kod vaši i buva. Ljudi i konji su slučajni domaćini virusa Zapadnog Nila. Razlog tome je nizak stepen viremije koja se razvija u organizmu ljudi i konja i koja ne dozvoljava dalje širenje virusa.

Virus Zapadnog Nila se prenosi i održava u prirodi u ciklusu komarac – ptica gde su ptice rezervoari virusa i prirodni domaćini. Za region jugoistočne Evrope je posebno značajan komarac roda *Culex* kao vektora infekcije. Kod ptica je ustanovljen visok stepen viremije koja omogućava inficiranje komaraca. Iz organizma ptica se virus putem fecesa izlučuje u spoljašnju sredinu čime je omogućeno prenošenje virusa na druge ptice.

U procesu širenja virusa sa jedne teritorije na drugu, poseban značaj pridaje se migratornim pticama. One se inficiraju ubodom komaraca i mogu razviti viremiju koja traje i do 100 dana kada se dalje mogu inficirati komarci tokom hranjenja na viremičnim pticama. Ljudi se inficiraju ubodom zaraženog komarca, a zabeleženi su slučajevi prenosa virusa i transfuzijom krvi, transplantacijom organa itd.

Virus groznice Zapadnog Nila izaziva klinički manifestna oboljenja kod ptica, konja i ljudi. Na osnovu do sada dostupnih podataka oko 25% obolelih ljudi ispoljava povišenu telesnu temperaturu i druge kliničke simptome oboljenja koji su slični gripu. Manje od 1% obolelih ljudi ispoljava neurološke poremećaje koji se mogu završiti smrtnim ishodom. Kod najvećeg broja obolelih ljudi infekcija prolazi asimptomatski. Kod konja često dolazi do ispoljavanja simptoma oboljenja nervnog sistema u vidu ataksije, podrhtavanja mišića, opšte slabosti i u nekim slučajevima uginuća.

Pojava serokonverzije izazvane virusom Zapadnog Nila je utvrđena kod konja, ptica, ljudi, kokoši, goveda, pasa, svinja, magaraca, koza, golubova, vrabaca i drugih domaćih i divljih životinja. Programi monitoringa ove bolesti uključivali su prikupljanje uzoraka poreklom od različitih vrsta životinja kao na primer domaće živine, konja, divljih ptica i komaraca i utvrđivanje prisustva infekcije, odnosno kontakta za virusom Zapadnog Nila bilo direktno (detekcijom prisustva virusa) ili indirektno (detekcijom prisustva specifičnih antitela). Osnovni zadatak sprovođenja programa monitoringa groznice Zapadnog Nila kako kod nas, tako i u svetu, jeste pravovremeno otkrivanje prisustva i cirkulacije virusa na nekom području, kao i određivanje početka sezone cirkulacije virusa u enzootskim/endemskim područjima u cilju blagovremenog informisanja, kontrole vektora i preveniranja infekcije ljudi i životinja i sprečavanja pojave epidemija i epizootija.

U Republici Srbiji se od 2014. godine sprovode programi monitoringa groznice Zapadnog Nila u kojima je vršeno prikupljanje uzoraka poreklom od konja, komaraca, divljih ptica, odnosno domaće živine koja se kao sentinel vrsta koristila samo tokom sprovođenja monitoring programa 2014. godine.

Dosadašnji rezultati sprovođenja monitoring programa groznice Zapadnog Nila u Republici Srbiji ukazali su na to da konji kao sentinel vrsta, nisu dovoljno podesni za praćenje prisustva/cirkulacije virusa Zapadnog Nila u prirodi, s obzirom na to da je velika populacija konja, posebno na području severa Republike Srbije već serološki pozitivna (prisustvo IgG antitela). U Republici Srbiji je od 2015. godine u sprovođenju

monitoringa utvrđivano samo prisustvo IgM antitela u uzorcima krvnog seruma konja kao dokaz prisustva skorašnje infekcije.

Iz navedenih razloga se danas u svetu uvode nove sentinel vrste za praćenje pojave groznice Zapadnog Nila kao što su živina, svinje, goveda itd. Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti uvođenja potencijalno novih sentinel vrsta u monitoring programe groznice Zapadnog Nila koji se sprovode u Republici Srbiji. Treba napomenuti da su podaci o korišćenju goveda i svinja kao potencijalnih sentinel vrsta za praćenje cirkulacije virusa groznice Zapadnog Nila do danas prilično oskudni kako u stranoj, tako i u domaćoj literaturi. Ovo se posebno odnosi na goveda i svinje čija se brojnost i rasprostranjenost čine odgovarajućim za izbor ovih vrsta životinja kao potencijalnih sentinel vrsta. Iz tog razloga, istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije je praćena pojava serokonverzije kod domaće živine, goveda i svinja na teritoriji Južnobanatskog okruga. Razlog tome je značajno prisustvo virusa groznice Zapadnog Nila na prostoru Južnobanatskog okruga koje se tokom proteklih osam godina pokazalo kao endemsko područje pojave groznice Zapadnog Nila, sa desetinama obolelih ljudi i smrtnih ishoda. Imajući u vidu navedene podatke, uvođenje goveda i svinja kao potencijalnih sentinel vrsta bi značajno poboljšalo procenu rizika za zdravlje ljudi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Istorijat groznice Zapadnog Nila, biološke osobine virusa i patogenez

Virus Zapadnog Nila pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* i izaziva groznicu Zapadnog Nila. Rezervoari virusa Zapadnog Nila su ptice i neki rodovi komaraca. Ljudi i konji su krajnji, odnosno slučajni domaćini virusa kod kojih virus izaziva ili inaparentne ili blage infekcije, ali i infekcije sa izraženim kliničkim simptomima koje se mogu završiti smrtnim ishodom (Ahmadinejad, 2012).

Do danas je prisustvo virusa Zapadnog Nila potvrđeno na teritoriji Afrike, Južne Evrope, Bliskog Istoka, Indije, Australije i Severne Amerike. Virus Zapadnog Nila je na osnovu dobijenih rezultata seroloških ispitivanja grupisan zajedno sa virusom Japanskog encefalitisa, zatim virusom Sent-Luis encefalitisa, odnosno Usutu virusom. Sve do kraja 1990. godine za virus Zapadnog Nila se smatralo da ne predstavlja značajan rizik po zdravlje ljudi i konja iz jednostavnog razloga što se pojavljivao isključivo sporadično. Međutim, od pojave epidemije u Rumuniji 1996. godine ovo stanovište se promenilo i virus Zapadnog Nila je postao značajan problem u humanoj i veterinarskoj medicini (Dauphin i sar., 2007).

Virus Zapadnog Nila je prvi put identifikovan u uzorku krvi žene koja je ispoljila kliničke simptome povišene telesne temperature. Ova osoba je bila poreklom iz Ugande, distrikta *West Nile*, a bolest je detektovana 1937. godine. Infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila je pedesetih godina prošlog veka potvrđena kod ljudi na teritoriji Izraela. Od tada je bilo sporadičnih izveštaja oboljenja kod ljudi i na teritoriji Albanije, Bugarske, Belorusije, Ukrajine i Moldavije. Međutim, treba naglasiti da je do devedesetih godina prošlog veka aktivnost virusa bila veoma niska, da bi posle toga ona porasla što se manifestovalo povećanjem broja obolelih i težinom kliničkih simptoma. U poslednje vreme prisustvo virusa Zapadnog Nila i pojava oboljenja kod ljudi i životinja potvrđena je na teritoriji Alžira, Maroka, Tunisa, Egipta, Izraela, Rumunije, Rusije, Poljske, Češke, Mađarske, Hrvatske, Srbije, Francuske, Portugalije, Španije i Italije. Virus Zapadnog Nila je identifikovan i na području Afrike, jugoistočne Azije i severne Amerike (Martin-Acebes i sar., 2012).

Ovaj virus poseduje jednolančani molekul RNK koji je pozitivno orijentisan. Genomska RNK virusa sadrži jedan ORF (*Open Reading Frame*) region koji kodira sintezu deset virusnih proteina uglavnom uključenih u proces replikacije virusa i to tri strukturna proteina virusa (C, prM i E) i sedam nestrukturnih proteina (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5) (Ahmadinejad, 2012). Virion virusa Zapadnog Nila sadrži dva površinska glikoproteina premembranski/membranski prM/M glikoprotein (posle cepanja je ovo membranski M glikoprotein) i glikoprotein omotača ili E glikoprotein. Oba ova glikoproteina formiraju heterodimere. Glikoproteini M i E virusa su odgovorni za neke biološke osobine virusa kao što su replikacija virusa, tropizam prema tkivima, formiranje virusne čestice, odnosno za stimulaciju humornog i ćelijskog imunološkog odgovora organizma (Dauphin i sar., 2007). Virion virusa Zapadnog Nila na svojoj površini nema projekcije u vidu šiljaka ili nekih drugih sličnih tvorevina (Martin-Acebes i sar., 2012).

Proces infekcije ćelije uključuje najpre vezivanje virusa za receptore na površini ćelije (glikozaminoglikane, C-tip lektina). Virusna čestica ulazi u ćeliju domaćina mehanizmom koji zavisi od klatrina, a unutar ćelije se virusna čestica transportuje preko ćelijskog aktina i mikrotubula. Posle oslobađanja, virusna RNK dospeva u citoplazmu ćelije domaćina i započinje njena replikacija po modelu poznatom za replikaciju jednolančanih RNK virusa i to preko sinteze jedne negativno orijentisane jednolančane RNK koja zatim služi kao model za sintezu većeg broja kopija pozitivno orijentisane RNK koje ulaze u sastav novih viriona. Replikacija virusa u ćelijama domaćina dovodi do apoptoze inficirane ćelije. Kapsidni protein virusa Zapadnog Nila ili C protein uključen je u proces formiranja virusne čestice i replikaciju virusa. Glikoprotein prM/M je kratak transmembranski glikozilovani protein koji je povezan sa spoljašnjim omotačem virusa. Ovaj glikoprotein je podložan cepanju pod dejstvom proteaza što je neophodan proces za sazrevanje virusne čestice. Glikoprotein E spoljašnjeg omotača virusa Zapadnog Nila je transmembranski protein i izrazito imunogen glikoprotein virusa. Ovaj protein je glikozilovan na poziciji 154 kod većine sojeva virusa Zapadnog Nila. Glikozilacija je veoma značajna za efikasno prenošenje virusa u populaciji komaraca i ptica. Ovaj glikoprotein virusa poseduje tri domena DI, DII i DIII. Pored ovih strukturnih, virus Zapadnog Nila poseduje i nestrukturne proteine. NS1 je virusni glikoprotein i nestrukturni protein virusa koji ima veoma značajnu ulogu u replikaciji virusa. Pored ovog nestrukturnog proteina, postoje još NS2A, NS2B, NS3 (visoko konzerviran protein virusa), NS4A, NS4B kao i najveći protein kodiran od strane virusa označen kao nestrukturni protein NS5 (Martin-Acebes i sar., 2012.).

Virus Zapadnog Nila ima, za sada, samo jedan identifikovan serotip, ali na nivou genomske RNK utvrđene su značajne genske varijacije. Imajući to u vidu, sojevi virusa su ranije bili podeljeni u dve linije koje se međusobno razlikuju u genskoj strukturi i do 30%. Linija 1 virusa Zapadnog Nila uključuje sojeve virusa koji su prisutni u Africi, Mediteranskom basenu, Južnoj Evropi, Indiji, Australiji i Americi, dok je linija 2 virusa prisutna u podsaharskoj Africi i Madagaskaru. Za sojeve koji pripadaju ovoj liniji se smatra da uglavnom nisu patogeni (Dauphin i sar., 2004.). Iako virus Zapadnog Nila ima samo jedan serotip, na nivou nukleinske kiseline virusa utvrđene su značajne genske varijacije. Do danas je primenom metode sekvenciranja virusnog genoma i filogenetske analize, potvrđeno postojanje osam evolucionih – genetskih linija virusa od kojih se neke dalje mogu podaliti u klade i to: 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4a, 4b, 4c, 5, 6 i 7. Liniji 1 virusa Zapadnog Nila pripadaju sojevi identifikovani u Africi, Mediteranskom basenu, Južnoj Evropi, Indiji, Australiji i Americi, dok liniji 2 pripadaju sojevi virusa u Subsaharskoj Africi i Madagaskaru. Sojevi koji pripadaju liniji 2 virusa identifikovani su i na teritoriji Centralne Evrope, u Mađarskoj i Austriji, odnosno na teritoriji Rumunije, Grčke, Italije i Srbije. Pored ove dve linije virusa, postoje i linija 3 virusa u koju su svrstani sojevi virusa nepoznate patogenosti za ljude, a koji su izolovani kod *Culex pipiens* komaraca u Češkoj kao i linija 4 u koju je svrstan soj virusa Zapadnog Nila izolovan iz krpelja *Dermacentor marginatus* 1998. godine u Rusiji (Wodak i sar., 2011; Pachler i sar., 2014.).

Linije virusa su dalje podeljene na klade u kojima su svrstani sojevi virusa u zavisnosti od mesta geografskog porekla. Linija 1 virusa Zapadnog Nila je podeljena u tri odvojene klade. Klada 1a obuhvata sojeve virusa koji su identifikovani na teritorijama Afrike, Evrope i Amerike. Klada 1b obuhvata australijski Kunjin virus koji je zapravo podtip virusa Zapadnog Nila i klada 1c obuhvata sojeve virusa izolovane na teritoriji Indije. Sojevi virusa koji pripadaju kladi 1a su između sebe veoma genski

slični uprkos geografskoj udaljenosti područja na kojima su izolovani i identifikovani. Smatra se da je ova pojava uzrokovana unošenjem različitih sojeva virusa poreklom iz drugih geografskih područja na jednu teritoriju preko ptica selica. Klada 1a je dalje podeljena u različite klastere. Kao što je prethodno navedeno linija 2 virusa uključuje sojeve virusa identifikovane na teritorijama Afrike, Madagaskara, Centralne Evrope i Jugoistočne Evrope. Takođe je već prethodno naglašeno da postoje linija 3 virusa u koju su svrstani sojevi nepoznate patogenosti za ljude, a koji su izolovani kod *Culex pipiens* vrste komaraca u Češkoj kao i linija 4 u koju je svrstan virus Zapadnog Nila izolovan iz krpelja *Dermacentor marginatus* 1998. godine u Rusiji. Liniji 4 virusa pripada i soj virusa identifikovan u Španiji. Soj virusa Zapadnog Nila izolovan u Maleziji i Koutango afrički soj virusa mogu da budu svrstani u potpuno odvojenu, dodatnu liniju virusa Zapadnog Nila (Martin-Acebes i sar., 2012).

Kao što je prethodno navedeno infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila je prisutna u Africi, Bliskom Istoku, Evropi i Aziji. Pojava infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila je zabeležena 50-tih godina prošlog veka na teritoriji Egipta i Izraela, 60-tih godina u Francuskoj, odnosno 70-tih prošlog veka u Južnoj Africi. Od 1990. godine i dalje, infekcija izazvana ovim virusom je utvrđena u Rumuniji 1996. godine, Maroku 1996-2003. godine, Italiji 1998. godine, Rusiji 1999. godine, Izraelu 1998. do 2000. godine, odnosno Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Kanadi 1999. godine (Dauphin i sar., 2007).

Na osnovu dostupnih literaturnih podataka kod nas i u svetu poznato je da virus Zapadnog Nila u prirodi opstaje u enzootskom ciklusu između komaraca i ptica. Rod komaraca *Culex* posebno vrste *C. pipiens*, *C. tarsalis* i *C. quinquefasciatus* su važni prenosioci virusa u severnoj Americi. Za širenje virusa zaslužne su i migratorne ptice. One postaju inficirane posle uboda inficiranih komaraca i mogu razviti viremiju koja traje do 100 dana; takve jedinke predstavljaju rezervoar virusa za neinficirane komarce nakon uzimanja obroka krvi na viremičnim pticama. Konji i ljudi su krajnji domaćini virusa i nemaju dovoljno visok titar virusa u krvi koji bi inficirao komarce.

2.2. Klinička slika kod ljudi, životinja i prevencija

2.2.1. Klinička slika kod ljudi

Ljudi se inficiraju posle uboda komaraca, a mogu i transfuzijom krvi, transplantacijom organa itd. Najveći broj inficiranih ljudi ne ispoljava kliničke simptome bolesti, 20% ljudi ima povišenu telesnu temperaturu, a samo 1% ima akutnu neuroin vazivnu bolest sa pojavom encefalitisa, meningoencefalitisa, meningitisa, kao i akutne facijalne paralize. Na teritoriji SAD u leto 2012. godine došlo je do izbijanja oboljenja sa više od 1800 ljudi. Do danas je u SAD registrovano oko 41000 slučajeva pojave oboljenja kod ljudi sa 1700 smrtnih ishoda. Autori ovih istraživanja navode jedan veoma važan podatak da je prisustvo IgM u krvi indikator aktivne infekcije ljudi jer se ova antitela pojavljuju tri dana nakon infekcije. Titar ovih antitela opada u periodu od dva do tri meseca (Garcia i sar., 2015).

Ljudi su osetljivi na infekciju izazvanu virusom Zapadnog Nila koja uglavnom prolazi asimptomatski. Samo oko 20% inficiranih ljudi ispolji kliničke simptome povišene telesne temperature, glavobolje, slabosti koje traju od tri do šest dana. Manje

od 1% pacijenata ispolji kliničke simptome meningitisa, encefalitisa ili mijelitisa koji se mogu završiti smrtnim ishodom, posebno kod starijih pacijenata. Klinički simptomi bolesti se javljaju između drugog i petnaestog dana posle infekcije i traju od 2 do 5 dana. Nervni simptomi bolesti mogu trajati nekoliko nedelja, a u nekim slučajevima imati i trajne posledice. Prisustvo hepatitisa, pankreatitisa i miokarditisa je takođe zabeleženo kod određenog broja obolelih ljudi. Popović i sar. (2013) su opisali prvi prijavljeni slučaj groznice Zapadnog Nila kod ljudi u Srbiji u 2012. godini. Od 58 obolelih ljudi njih 32 je u epidemiološkoj anketi navelo da provodi duži vremenski period u prirodi, blizu reke i da je imalo ubode komaraca. Najveći broj obolelih je bio iz Beograda, a 6 obolelih je sa područja Južnog Banata. Prvi dijagnostikovani slučaj oboljenja groznice Zapadnog Nila poticao je iz Pančeva, region Južnog Banata.

2.2.2. Klinička slika kod životinja

Kod konja infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila dovodi do sličnih kliničkih simptoma kao i kod ljudi. Oko 10% obolelih grla ispoljava neurološke simptome bolesti. Na težinu kliničkih simptoma utiče starost životinje, uslovi držanja, virulencija soja virusa koji je izazvao infekciju, osetljivost rase itd. Najznačajniji klinički simptomi su pareza ekstremiteta, atonija, tremor itd. Stepenn smrtosti kod konja u SAD, Francuskoj, Italiji i Izraelu se kreće od 20% do 57%. (Dauphin i sar., 2007)

Kod ptica dolazi do ispoljavanja oboljenja nervnog sistema koje je praćeno ataksijom i paralizom, odnosno dolazi do neuroloških promena kao što su depresija, letargija, ali i gubitka telesne težine i miokarditisa. Uginuće, ako nastupi, nastaje 24 sata posle pojave kliničkih simptoma bolesti. Virus kod ptica napada i unutrašnje organe kao što su jetra, bubrezi, srce, slezina (Martin-Acebes i sar., 2012).

2.2.3. Prevencija

Do danas ne postoji vakcina odobrena za upotrebu kod ljudi, ali sa druge strane, postoje veoma efikasne vakcine za konje. U SAD su u upotrebi tri komercijalne vakcine jedna inaktivisana, jedna rekombinantna živa vakcina i jedna plazmidska vakcina. Danas se poseban značaj pridaje prevenciji i kontroli infekcije koja podrazumeva pored vakcinacije, kontrolu vektora i primenu zoohigijenskih mera. Ovo poslednje obuhvata upotrebu repelenata u svakodnevnoj praksi, dezinfekciju prostorija, čišćenje prostorija u kojima borave životinje, uklanjanje leševa ptica itd. (Martin-Acebes i sar., 2012.)

2.3. Laboratorijska dijagnostika Groznice Zapadnog Nila

Laboratorijska dijagnostika groznice Zapadnog Nila zasniva se na izolaciji virusa, zatim utvrđivanju prisustva virusne nukleinske kiseline u uzorcima krvi i tkiva primenom RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*, RT-PCR) ili *real time* RT-PCR kao i utvrđivanjem prisustva specifičnih IgM ili IgG antitela u uzorcima krvnog seruma ili cerebrospinalne tečnosti (likvora) imunoenzimskim – ELISA ili virus neutralizacionim – VN testom. Guerrero-Carvajal i sar. (2020) su koristili dva komercijalna ELISA testa za utvrđivanje prisustva specifičnih IgG i IgM antitela kako bi utvrdili seroprevalenciju kod konja. Svi uzorci koji su reagovali pozitivno ili sumnjivo ELISA testovima potvrđivani su virus neutralizacionim testom.

Svi pozitivni uzorci su virus neutralizacionim testom paralelno ispitani i na prisustvo antitela na Usutu virus. Ovom studijom obuhvaćeno je 725 kopitara, i kod 199 konja metodom kompetitivnog cELISA testa utvrđena su specifična antitela protiv virusa Zapadnog Nila što čini seroprevalenciju od 27,5%, dok je 22 reagovalo sumnjivo. ELISA testom za utvrđivanje IgM antitela ustanovljena su IgM antitela kod 16 konja, što čini seroprevalenciju od 2,2%, dok su 3 uzorka reagovala sumnjivo. Serumi koji su reagovali pozitivno ili sumnjivo na oba ELISA testa su radi potvrde ispitani virus neutralizacionim testom, kojim je od 226 seruma potvrđeno prisustvo specifičnih antitela kod 143 kopitara, čime je utvrđena seroprevalencija od 19,7%. Pored ovoga, virus neutralizacionim testom su utvrđena antitela na Usutu virus kod 11 kopitara. Dobijeni rezultati su potvrdili da virus Zapadnog Nila i Usutu virus cirkulišu u regionu zapadne Španije, što je ukazalo na potrebu uspostavljanja monitoringa virusa Zapadnog Nila. Long i sar (2006) su ispitivali osetljivost i specifičnost IgM ELISA testa za dijagnostikovanje bolesti Zapadnog Nila kod konja. U studiju je bilo uključeno 36 sigurno pozitivnih konja i 381 konja iz neinficiranih zapata. Svih 417 konja je testirano radi ispitivanja osetljivosti i specifičnosti ELISA testa, iz grupe od 36 sigurno pozitivnih konja pozitivno je reagovalo 33 konja što daje osetljivost testa od 91,7%. Iz grupe od 381. neinficiranog konja negativno je reagovalo 379 konja, što daje specifičnost od 99,4%. Posle utvrđivanja osetljivosti i specifičnosti testa, ispitano je 602 uzoraka krvnih seruma konja, uzorkovanih u periodu 2001. do 2003. godina sa teritorije države Florida, koji su ispoljili simptome poremećaja nervnog sistema. Korišćenjem standardnih kriterijuma ovog dijagnostičkog metoda utvrđena su specifična IgM antitela kod 194 konja, što daje seroprevalenciju od 32%. Pomeranjem granične vrednosti („cut off“) utvrđena su specifična antitela kod 208, odnosno 225 konja, što daje seroprevalenciju od 37%. Zaključak je da je ELISA test koji se koristi za detekciju IgM antitela kao indikatora skorašnje infekcije virusom Zapadnog Nila, pouzdan. Ova studija je pokazala da se ELISA test za utvrđivanje specifičnih IgM antitela može koristiti kao potvrda bolesti kod konja sa nervnim simptomima, i sa korišćenjem standardnih graničnih vrednosti testa. Ocenjeno je da konji koji su reagovali negativno najverovatnije nisu bili inficirani. Shirato i sar. (2005) su uspostavili protokol za izvođenje *real-time* RT-PCR koji su koristili za identifikaciju virusa Zapadnog Nila i virusa Japanskog encefalitisa. I ovde kao i u prethodno opisanom ispitivanju je određivana specifičnost i osetljivost novog protokola za izvođenje *real time* RT-PCR korišćenjem više sojeva linija 1 i 2 virusa Zapadnog Nila, zatim više sojeva virusa Japanskog encefalitisa kao i drugih flavivirusa kao što je Denga virus. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se opisani protokol može koristiti u simultanoj dijagnostici nabrojanih virusa, naročito u endemskim područjima kakva je istočna Azija. Danas postoji veći broj protokola za izvođenje *real time* RT-PCR koji se koriste u laboratorijskoj dijagnostici virusa Zapadnog Nila. Jedan od tih protokola je uspostavljen od strane Zink i sar. (2013). Ovaj protokol za izvođenje *real time* RT-PCR je korišćen za istovremenu identifikaciju Istočnog encefalitisa konja i groznice Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da tokom ispitivanja nije došlo do unakrsnih reakcija između dva virusa, kao ni unakrsne reakcije sa drugim ispitanim arbovirusima. Ovo praktično znači da je tokom ispitivanja potvrđena osetljivost i specifičnost novouspostavljenog protokola za izvođenje metode koji se kao takav, po mišljenju autora, može koristiti za sprovođenje monitoringa virusa Zapadnog Nila kod ljudi i životinja. Faggioni i sar. (2014) su kao rezultat svojih ispitivanja uspostavili protokol za izvođenje *real time* RT-PCR koji je omogućio detekciju i genotipizaciju dve glavne linije virusa Zapadnog Nila, linije 1 i 2.

Za izvođenje ovog protokola korišćen je jedan par prajmera i proba koji su identifikovali prisustvo visoko konzervirane konsenzus sekvence otkrivene na 5' terminalnom kraju genoma virusa. Laboratorijska dijagnostika virusa Zapadnog Nila je od izuzetnog značaja za pravovremeno sprečavanje ove značajne bolesti ljudi i životinja. Vázquez i sar. (2016) su u svom radu opisali novi protokol za izvođenje metode *real time* RT-PCR koji je namenjen za identifikaciju sojeva virusa koji pripadaju svim do sada poznatim i opisanim linijama virusa Zapadnog Nila. U ovim ispitivanjima je utvrđivana osetljivost i specifičnost protokola za izvođenje *real time* RT-PCR. Validacija protokola za laboratorijsku primenu je izvršena korišćenjem različitih sojeva virusa Zapadnog Nila, zatim kroz ispitivanje uzoraka poreklom od ljudi (cerebrospinalna tečnost, tkiva prikupljena prilikom biopsije, uzorci krvnog seruma i plazme) kao ispitivanjem zbirnih uzoraka komaraca. Dobijeni rezultati su pokazali visoku specifičnost i osetljivost novog protokola za izvođenje *real time* RT-PCR, odnosno tokom ispitivanja je potvrđeno da primenjeni protokol nije dovodio do amplifikacije delova genoma srodnih virusa (Usutu virus, virus Japanskog encefalitisa, Denga virus, virus žute groznice itd.). Iz prethodno navedenih razloga, autori ovog istraživanja smatraju da se novi protokol za izvođenje *real time* PCR može koristiti za sprovođenje programa monitoringa virusa Zapadnog Nila kod ljudi i životinja. Pored već spomenutih protokola, protokol za izvođenje *multiplex real time* RT-PCR za simultanu identifikaciju linija 1 i 2 virusa Zapadnog Nila i Usutu virusa razvili su Del Amo i sar., 2013. U ispitivanjima je korišćeno više prajmera i proba. Ispitivana je osetljivost i specifičnost novouspostavljenog protokola korišćenjem više različitih sojeva virusa koji su pripadali liniji 1 i liniji 2 virusa Zapadnog Nila, odnosno Usutu virusa. Validacija novog protokola za izvođenje *real time* RT-PCR je izvršena korišćenjem većeg broja različitih uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili visoku osetljivost i specifičnost novog protokola za izvođenje *real time* RT-PCR.

Imajući u vidu izbijanje nekoliko epidemija izazvanih virusom Zapadnog Nila na teritoriji Tunisa u poslednjih dvadeset godina, Wasfi i sar. (2016) su izvršili prikupljanje uzoraka komaraca na teritoriji Centralnog Tunisa u cilju ispitivanja na prisustvo flavivirusa. Ukupno je prikupljeno 102 uzorka *Culex pipiens* komaraca tokom septembra 2014. godine. Svi prikupljeni uzorci su ispitani primenom metode *heminested* RT-PCR i primenom metode *real-time* RT-PCR uz korišćenje prajmera za virus Zapadnog Nila. Svi prikupljeni uzorci komaraca su najpre „pulovani“, a zatim ispitani. Od ukupno 21 ispitanih pulovanih uzoraka komaraca, kod 7 pulova utvrđeno je prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila. U ispitanim uzorcima nije utvrđeno prisustvo nijednog drugog flavivirusa. Iz pozitivnih uzoraka komaraca izvršena je i izolacija virusa Zapadnog Nila na Vero ćelijskoj liniji. Rezultati filogenetske analize su potvrdili da sojevi virusa Zapadnog Nila identifikovani na teritoriji Tunisa u ovim ispitivanjima pripadaju liniji 1 i da su blisko srodni sa sojem virusa identifikovanom u Tunisu koji je poznat pod nazivom soj Tunis 1997 (soju PAH 001 detektovanom još 1997. godine). Ova ispitivanja potvrđuju da su neke regije Tunisa u visokom riziku od izbijanja groznice Zapadnog Nila kod ljudi i životinja.

2.4. Epizootiologija i monitoring virusa Zapadnog Nila; Sentinel vrste

U literaturi koja se bavi virusom Zapadnog Nila i njegovom epizootiologijom posebno mesto zauzimaju radovi koji se odnose na filogenetsku analizu do sada identifikovanih sojeva virusa koja se sprovodi radi utvrđivanja sličnosti ili razlika između sojeva virusa

kako bi se dobili podaci o istorijatu prisustva pojedinih sojeva virusa Zapadnog Nila na određenoj teritoriji. Therrien i sar. (2019.) navode da je prisustvo virusa Zapadnog Nila na zapadnoj hemisferi prvi put potvrđeno 1999. godine i to na teritoriji Njujorka. Do sada su na teritoriji SAD i Kanade identifikovana tri genotipa virusa Zapadnog Nila. O evoluciji virusa na teritoriji Kanade do sada ne postoji mnogo podataka. U ovim ispitivanjima je izvršena molekularna karakterizacija i filogenetska analiza ukupno 26 genoma sojeva virusa Zapadnog Nila izolovanih iz uzoraka komaraca (ukupno 44000 uzoraka komaraca) prikupljenih na teritoriji provincije Kvebek u Kanadi u periodu od 2003. do 2006. godine i od 2013. do 2016. godine kada su sprovedeni postupci monitoringa virusa. Sojevi virusa izolovani u Kanadi su bili filogenetski srodni američkim sojevima virusa Zapadnog Nila koji su bili detektovani u severnim i južnim delovima SAD. Istovremeno, tokom ispitivanja je potvrđeno postojanje dve monofiletske grupe virusnih izolata koje je karakterisalo postojanje različitih konzerviranih aminokiselinskih motiva. Ovi aminokiselinski motivi su bili prisutni kod 14 izolata virusa, a nisu bili utvrđeni kod drugih genotipski dominantnih (NA/WN02) izolata virusa na području SAD. Ispitivanje evolucije virusa Zapadnog Nila i njegov genetski diverzitet ispitivali su Chaintoutis i sar. (2019). Predmet interesovanja autora je bio pokušaj otkrivanja porekla virusa i puteva njegovog prenošenja u Evropu, posebno na teritoriju Balkanskog poluostrva. U navedene svrhe izvršena je analiza većeg broja kompletnih genskih sekvenci virusa Zapadnog Nila i sekvence virusa koji je identifikovan u Grčkoj 2018. godine. U ovim ispitivanjima je potvrđeno da najveći broj sojeva virusa Zapadnog Nila poreklom iz Centralne Evrope pripada liniji 2 virusa i da je grupisan u dve filogenetske podgrupe (Centralna i Jugozapadna Evropa i Balkan). Tokom ispitivanja je utvrđeno prisustvo 32 aminokiselinske supstitucije kod različitih filogenetskih podgrupa virusa ukazujući da je genski drift odgovoran za najveći broj evolucionih promena u genomu virusa. Interesantno je napomenuti da su autori utvrdili da su tri nova, nezavisna ulaska virusa iz Mađarske i Bugarske bila odgovorna za ponovnu pojavu infekcije u Grčkoj 2018. godine. Ovim istraživanjem su potvrđene sumnje da je Mađarska i dalje solidna ekološka niša za virus Zapadnog Nila i da ima centralnu ulogu u diseminaciji, odnosno širenju novih sojeva virusa na druge delove Balkanskog poluostrva. Autori iz tog razloga smatraju da je primena odgovarajućih programa monitoringa u kontroli infekcije kod ljudi i životinja izuzetno značajna. Uz to, molekularne metode su se pokazale kao idealne u identifikaciji delova genoma virusa Zapadnog Nila u različitim uzorcima poreklom od životinja i ljudi.

Duggal i sar. (2015) su opisali više od 100 sekvenci sojeva virusa Zapadnog Nila identifikovanih kod komaraca prikupljenih na teritoriji Kalifornije u periodu od 2003. do 2011. godine kada je sproveden program monitoringa virusa. Dobijeni rezultati potvrdili su pet nezavisnih ulazaka virusa Zapadnog Nila na teritoriju Kalifornije. Takođe, potvrđeno je da je genotip SW03 virusa bio ograničen na jugozapadne delove SAD i da ovaj genotip ima veliku brzinu širenja u populaciji komaraca. Autori takođe navode da je geografska ograničenost sojeva virusa Zapadnog Nila u jednom regionu u periodu od šest godina, ukazala na to da je održavanje virusa na jednoj teritoriji bilo više vezano za rezidentne vrste životinja na toj teritoriji, nego za migratorne ptice ili preživljavanje virusa kod komaraca tokom zime.

Virus Zapadnog Nila se uglavnom prenosi u populaciji životinja i ljudi preko komaraca koji pripadaju rodu *Culex* koji su ujedno i najefikasniji od svih vektora virusa. U Evropi su *Culex* komarci glavni vektori virusa. Nekoliko drugih vrsta komaraca su vektori virusa u drugim geografskim područjima – *Cx. univittatus* u Africi, *Cx. annulirostris* u

Australiji i *Cx. vishnui* i *Cx. tritaeniorhynchus* u Aziji. Pored komaraca, virus Zapadnog Nila se sporadično izoluje iz uzoraka artropoda, vaši ili buva. U ciklusu prenošenja virusa, pored komaraca, uključene su i ptice kao vrste u kojima se on intenzivno replikuje. Prilikom uboda, komarci koji u pljuvačnim žlezdama nose virus inficiraju ptice. U organizmu ptica, virus se replikuje i nastaje viremija koja se javlja za jedan do četiri dana posle ulaska virusa u organizam. Zbog prisutne viremije, ptice su prirodni rezervoari virusa, koji se prenosi na druge komarce, a zatim i na ljude i životinje. Danas se zna da je najmanje 198 vrsta ptica uključeno u ciklus održavanja i prenošenja virusa u populaciji životinja i ljudi. U Evropi su uginuća ptica izazvana virusom Zapadnog Nila veoma retka, dok su zabeleženi slučajevi uginuća u Izraelu i SAD. Inficirane ptice izlučuju značajnu količinu virusa fecesom ili iscetkom iz usne šupljine. Na taj način omogućeno je direktno prenošenje virusa sa ptice na pticu i čak sa ptice na čoveka. Eksperimentalno je dokazana oralna infekcija ptica. Do danas je potvrđeno da se virus Zapadnog Nila može prenositi transfuzijom, transplantacijom organa, transplacentarno, a eksperimentalno je utvrđeno da se kod sisara i ptica može preneti direktnim kontaktom s iscetkom iz usne šupljine. Nekoliko drugih životinjskih vrsta je osetljivo na infekciju virusom Zapadnog Nila sa ili bez jasnog ispoljavanja kliničkih simptoma oboljenja. To su pre svega psi, mačke, ovce, svinje, goveda, zečevi, jeleni, rakuni, vukovi, medvedi, veverice. Međutim, viremija kod ovih životinja je niskog titra i nedovoljna da pokrene ciklus prenošenja virusa. Treba naglasiti da su ljudi i konji krajnji domaćin virusa jer viremija u njihovom organizmu nije dovoljna da omogući dalje prenošenje virusa putem komaraca. (Dauphin G. i sar., 2007; Martin-Acebes i sar., 2012). Komar (2001) smatra da su ptice pogodne vrste za otkrivanje, praćenje i prenošenje virusa u populacijama životinja. Dobijeni podaci o seroprevalenciji ukazuju da se živina i golubovi (gajeni na farmama) mogu koristiti kao sentinel vrste u praćenju infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila, posebno za severnoameričke sojeve virusa. Kod obe vrste ptica bilo utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u slučaju izbijanja epidemije na teritoriji Njujorka 1999.-2000. godine. Kao sentinel vrste ptica mogu se takođe koristiti golubovi i vrapci kao slobodnoživeće vrste ptica isključivo na područjima koja su evidentirana kao enzootska žarišta virusa. Goddard i sar., (2002) su ispitivali koje su vrste komaraca najkompetentniji vektori virusa Zapadnog Nila. U ispitivanjima je korišćeno 10 vrsta kalifornijskih komaraca iz 14 različitih geografskih regiona. Dobijeni rezultati su potvrdili da je *Culex pipiens* najefikasniji i da komarci iz roda *Culex* imaju značajnu ulogu kako u samom prenošenju virusa u populaciji životinja i ljudi, tako i u održavanju virusa na jednoj teritoriji. Monitoring infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila vršili su Blackmore i sar. (2003). Infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila je detektovana na Floridi u julu 2001. godine. Nakon toga, u narednih pet meseci u 56 od 67 okruga ove države vršen je monitoring. Tokom sprovođenja monitoringa utvrđena je infekcija virusom Zapadnog Nila kod 1106 divljih ptica, 492 konja, 194 sentinel živine i 12 ljudi. Virus je takođe identifikovan i izolovan iz 13 uzoraka komaraca roda *Culex*. Slična ispitivanja su vršena od strane Turell i sar. (2005). Ova ispitivanja su potvrdila da su sve *Culex* vrste komaraca kompetentni vektori virusa Zapadnog Nila i da učestvuju u njegovom prenošenju, odnosno u održavanju u populaciji životinja i ljudi. Neke vrste su kompetentniji vektori kao na primer *Culex tarsalis* u odnosu na *Culex nigripalpus*. Uglavnom se može reći da su sve *Culex* vrste komaraca kompetentni vektori virusa Zapadnog Nila. Ozkul i sar. (2006) su u svojim istraživanjima prikupili 40 uzoraka krvnog seruma magaraca, 63 uzorka krvnog seruma mačaka, 100 uzoraka seruma od

goveda, zatim 114 uzoraka od pasa, 259 uzoraka od konja, 100 uzoraka od ovaca kao i 88 uzoraka krvi ljudi sa različitih područja Turske. Ispitivanjima su obuhvaćene životinje iz 10 provincija ove zemlje. Svi uzorci krvnog seruma su ispitani neutralizacionim testom na Vero ćelijskoj liniji. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je 1 od 40 ispitanih uzoraka seruma magaraca bio pozitivan na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, zatim 4 od 100 uzoraka goveda, 43 od 114 uzoraka pasa, 35 od 259 uzoraka konja, jedan od 100 ispitanih uzoraka ovaca i 18 od ukupno 88 uzoraka poreklom od ljudi. Ovi rezultati pokazuju da su sisari izloženi virusu Zapadnog Nila i njemu srodnim virusima i da možda mogu da doprinesu održavanju cirkulacije virusa na jednom području pa čak i u slučaju kada životinje ne ispoljavaju kliničke simptome bolesti. Lefrancois i sar. (2005) su sproveli monitoring program na prisustvo virusa Zapadnog Nila kod konja i živine na području arhipelaga Guadeloupe. Ispitivanja uzoraka krvnog seruma su vršena primenom metode ELISA i testa redukcije plakova. Utvrđena je visoka prevalencija prisustva virusa Zapadnog Nila kod konja tokom 2003. godine i opadanje cirkulacije virusa u populaciji konja 2004. godine. Seropozitivni ekvidi i živina su nađeni u blizini šume mangrova u kojoj živi mnogo vrsta divljih ptica i komaraca. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je prenošenje virusa dramatično smanjeno u 2003. i 2004. godini u poređenju sa 2002. godinom. Kod konja nije utvrđena serokonverzija između januara 2003. i avgusta 2004. godine, a seroprevalencija virusa kod živine je 2003. i 2004. godine bila niska u poređenju sa 2002. godinom. U ovim ispitivanjima nije bilo uginulih divljih ptica. Tokom ovih ispitivanja nije bilo slučajeva oboljevanja kod ljudi i konja. Folly i sar. (2020) navode da je virus Zapadnog Nila unešen u Nemačku 2016. godine, ali nije detektovan do 2018. godine. Rana detekcija omogućava javnom zdravlju i veterinarskoj službi planiranje programa zaštite i razvoj epidemioloških modela. Metod rane detekcije korišćenjem sentinel konja u serološkom nadzoru primenjen je u Španiji, Nemačkoj i Africi. Tokom sezone vektora u 2019. godini u Jugoistočnom delu Engleske serološki su ispitani uzorci krvnog seruma konja metodom ELISA testa, radi utvrđivanja prisustva ukupnih antitela i IgM klase na virus Zapadnog Nila. Uslov je bio da konji borave u ovom delu Engleske u vreme uzorkovanja krvi. Uzorkovanje je vršeno u letnjim i jesenjim mesecima, u vreme pojačane aktivnosti vektora. Ukupno je ispitano 988 uzoraka krvnog seruma konja korišćenjem dva komercijalna ELISA testa i to kompetitivna cELISA za utvrđivanje specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila i ELISA test za utvrđivanje IgM antitela. Svi uzorci krvnog seruma koji su reagovali pozitivno na cELISA testu ispitani su ELISA testom za utvrđivanje IgM specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Od ukupno ispitanih 988 uzoraka krvnog seruma, pozitivno je reagovalo na cELISA 274 uzoraka, što čini seroprevalenciju od 27,7%. Od ovih 274 uzoraka, na IgM ELISA testu pozitivno su reagovala 2 uzorka, što autori objašnjavaju kao posledicu vakcinacije koja je obavljena u poslednjih 7 dana pre uzorkovanja krvi. Ostalih 272 konja su bili klinički zdravi, a pozitivan rezultat je verovatno posledica vakcinacije konja protiv virusa Zapadnog Nila, pre izvoza konja iz Velike Britanije (Folly i sar., 2020). U južnom delu Evrope bolest Zapadnog Nila se javlja sezonski, duži niz godina u Mediteranskom basenu, a u poslednje vreme i u Nemačkoj. Širenju bolesti doprinosi migracija viremičnih ptica, a u nedostatku nadzora nad divljim pticama, najčešće se prisustvo virusa Zapadnog Nila utvrdi kod konja i ljudi. U nadzoru bolesti Zapadnog Nila brojnih Evropskih i Afričkih zemalja testovi za dijagnostikovanje IgM antitela se koriste kao metod utvrđivanja skorašnje infekcije virusom Zapadnog Nila kod konja. Rezultati serološkog ispitivanja konja, u kombinaciji

sa rezultatima nadzora nad divljim pticama gde nije utvrđena RNK virusa Zapadnog Nila u uzorcima ptica, dokazi su da u Jugoistočnoj Engleskoj nema cirkulacije virusa u sezoni aktivnosti vektora u 2019. godini (Folly i sar., 2020).

Buckley i sar. (2006) su tokom 2004. godine na farmi u *Cambridgeshireu* u Velikoj Britaniji izvršili prikupljanje uzoraka krvnog seruma od tri grupe pilića gajenih na otvorenom, starosti od četiri dana koji su praćeni do 20. nedelje života. Poslednji uzorci krvnog seruma su prikupljeni sa 20 nedelja starosti životinja krajem oktobra 2004. godine, kada su spoljašnje dnevne temperature uticale na pad aktivnosti insekata u Velikoj Britaniji. Uzorci krvnog seruma pilića su zatim ispitivani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, Usutu virusa i Sindbis virusa primenom testa redukcije plakova. U ispitivanjima je učestvovala još jedna grupa oglednih pilića koja je gajena u zatvorenom i od koje su uzorci krvnog seruma bili prikupljeni u starosti od 9 nedelja. Rezultati ispitivanja su potvrdili serokonverziju za virus Zapadnog Nila kod sentinel pilića na oglednoj farmi. Maternalna antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod pilića su bila prisutna tri nedelje u krvi. Takođe u narednih nekoliko meseci kod zdravih pilića primenom metode imunoblota i indirektno imunofluorescencije je utvrđeno prisustvo antitela u uzorcima krvnog seruma (pilići koji su držani zatvoreni i od kojih su uzroci uzimani u devetoj nedelji posle izleganja). Takođe, treba napomenuti da je udeo seropozitivnih pilića bio je veći za virus Zapadnog Nila u odnosu na Usutu i Sindbis virus. Pokušaji izolacije virusa ili dokazivanja virusne nukleinske kiseline u uzorcima krvnog seruma pilića nisu uspeli. Rizzoli i sar. (2007) su ispitivali uzorke krvnog seruma kokoši i dokazali da je kod 90% sentinel kokoši koje su dopremljene u dva regiona u italijanskim Alpima potvrđena serokonverzija i prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom leta 2005. godine. Visina titra specifičnih antitela se u uzorcima krvnog seruma ispitujućih kokoši kretala od 1/20 do 1/320. Ispitivanja uzoraka krvnog seruma kokoši su vršena primenom testa redukcije plakova. Specifičnost testa je potvrđena ispitivanjem dodatnih 34 uzoraka krvnih seruma koji su istovremeno ispitani na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila (16/34), Usutu virusa (3/34) i Koutango virusa. Calistri i sar. (2010) navode da je infekcija virusom Zapadnog Nila bila potvrđena 2008. godine u osam italijanskih provincija koje se nalaze u tri regije (*Emilia Romagna, Veneto i Lombardia*). U ovim provincijama je ukupno detektovano 794 slučaja infekcije u 251. ergeli u kojima su gajeni konji. Samo 4 životinje kod kojih je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je ispoljavalo kliničke simptome bolesti. Značajan broj pozitivnih uzoraka je ustanovljen primenom RT-PCR kod različitih vrsta ptica čiji su uzorci ispitani u ovom periodu. Ulloa i sar. (2009) su prikupili ukupno 30000 komaraca i 351 uzorak krvnog seruma domaćih životinja sa teritorije Chiapas, Meksiko i ispitali ih primenom metoda RT-PCR, ELISA i testom redukcije plakova na prisustvo virusa Zapadnog Nila. Uzorci krvnog seruma prikupljeni su od konja, pilića, pataka, ćuraka, gusaka, svinja i goveda. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je od ukupno 351. ispitanog uzorka krvnog seruma poreklom od domaćih životinja, primenom metode ELISA kod 36 uzoraka utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, dok je 17 uzoraka seruma bilo pozitivno primenom testa redukcije plakova (pet poreklom od goveda, jedan poreklom od konja, pet poreklom od pilića i šest poreklom od ćuraka). U dva zbirna uzorka komaraca utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila. U pitanju su bili uzorci *Culex nigripalpus* i *Culex interrogator* komaraca. Prisustvo virusa Zapadnog Nila na teritoriji Portugalije opisali su Barros i sar. (2011). U periodu od 2004. do 2011. godine na teritoriji Portugalije prikupljeno je i ispitano ukupno 1313

uzoraka krvnog seruma konja, 52 uzorka seruma divljih ptica i 64 uzorka krvnog seruma ptica iz zoološkog vrta. Uzorci krvnog seruma su ispitani na prisustvo IgG antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA. Da bi se izbegla pojava unakrsnih reakcija, uzorci seruma pozitivni na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, metodom virus neutralizacije su ispitani na prisustvo antitela protiv drugih flavivirusa. Od ukupno 116 uzoraka krvnog seruma ptica, kod 23 uzorka je ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Titar antitela se kretao od 1:20 do 1:40. Antitela su utvrđena kod više vrsta divljih ptica koje su u vreme uzorkovanja bile klinički zdrave. Kod konja 40 od ukupno 1313 uzoraka seruma je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Titar antitela se kretao od 1:16 do 1:2560. Iako su uzorci seruma prikupljeni od klinički zdravih konja, dva od sedam seropozitivnih konja kod kojih je uzorkovanje vršeno u oktobru i novembru 2010. godine su ispoljavali neurološke simptome bolesti karakteristične za virus Zapadnog Nila. Ove životinje su bile na istoj ergeli konja koja se nalazila u provinciji Setubal, Portugalija. Jedan konj je uginuo, dok se drugi oporavio i kod njega je ustanovljena serokonverzija. Uzorci krvnog seruma konja i ptica ispitani na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila i primenom metode RT-PCR i svi su bili negativni. Monaco i sar. (2011) navode da je virus Zapadnog Nila u Italiji 2008. i 2009. godine izazvao pojavu oboljenja kod većeg broja ljudi i konja. U ispitivanjima su upoređivani celi genomi virusa koji su izazvali infekcije 2008. i 2009. godine u cilju utvrđivanja sličnosti ili razlika između njih. Takođe, u ovim ispitivanjima u uzorcima poreklom od komaraca, konja i ptica primenom seroloških i molekularnih metoda vršeno je otkrivanje prisustva virusa Zapadnog Nila. Uzorci su prikupljeni do 20 km šire od granične zone infekcije 2008. godine u severnoj Italiji region *Emilia Romagna*. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da između navedenih sojeva virusa postoji 99% sličnosti i da ponovna pojava oboljenja 2009. godine na gotovo istoj teritoriji na kojoj je bila 2008. godine, ukazuje na prezimljavanje virusa na toj teritoriji u organizmima konja, ptica i komaraca. Lupulovic i sar. (2011) su u svojim ispitivanjima izvršili prikupljanje uzoraka krvnog seruma konja tokom 2009. godine i 2010. godine u svim godišnjim dobima na teritoriji grada Beograda, Šapca i 26 opština u Vojvodini koje se graniče sa Hrvatskom, Mađarskom i Rumunijom. Uzorci seruma konja su ispitani primenom testa redukcije plakova, ELISA, izolacije virusa na ćelijskoj liniji i *real time* RT-PCR. Od 349 uzoraka konja kod 12% od ispitanih uzoraka je ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. U jednom slučaju je došlo do unakrsne reaktivnosti sa Usutu virusom. Ovo je prvi put da je kod uzoraka poreklom od jednog konja u Srbiji utvrđeno prisustvo unakrsno reaktivnih antitela protiv Usutu virusa. Predviđanja koja se odnose na cirkulaciju virusa Zapadnog Nila i rizici od pojave epidemije na jednoj teritoriji nisu uvek mogući, a uzrok tome je više faktora koji se međusobno prožimaju. Petrović i sar. (2014) su primenom metode ELISA ispitili 130 uzoraka krvnog seruma konja poreklom sa teritorije Autonomne Pokrajine (AP) Vojvodine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Tokom prikupljanja uzoraka krvnog seruma konja, vršeno je istovremeno i prikupljanje uzoraka komaraca koji su se nalazili u okolini konja od kojih su prikupljeni uzorci (6 ergela i jedno naseljeno mesto). Uzorci komaraca su ispitani na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila primenom metode *real-time* RT-PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 64 uzorka seruma konja, odnosno kod 49.23% od ukupno broja ispitanih uzoraka. Po jednoj štali procenat seropozitivnih životinja se kretao od 35% do 64%. U uzorcima prikupljenih

komaraca (31 zbirni uzorak) nije ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline virusa. Autori ovih ispitivanja naglašavaju da je prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod konja u 2012. godini iznosila 49,23% i bila je značajno veća od prevalencije infekcije utvrđene kod konja poreklom sa teritorije Vojvodine 2010. godine, koja je tada iznosila 12%. Barbić i sar. (2012) su u periodu od oktobra 2010. do aprila 2011. godine u različitim regionima Republike Hrvatske prikupljali uzorke krvi konja i goveda i ispitivali ih na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Pozitivni uzorci krvnog seruma konja i goveda utvrđeni primenom ELISA metode su potvrđivani primenom virus neutralizacionog testa (VN test) i testa neutralizacije plakova. Prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ustanovljeno je kod 72 uzorka seruma konja od ukupno 2098 ispitanih uzoraka, odnosno kod 3 uzorka krvnog seruma goveda od ukupno 2695 ispitanih uzoraka. Najveća seroprevalencija infekcije je utvrđena u istočnoj Hrvatskoj uz granicu sa Mađarskom, Srbijom i Bosnom i Hercegovinom. U drugim delovima države, u graničnom području sa Slovenijom i Italijom, takođe je utvrđeno prisustvo virusa. Dobijeni rezultati su pokazali da se infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila na teritoriji Hrvatske širi pravcem Istok - Zapad. Prisustvo pozitivnih konja u najzapadnijim delovima zemlje ukazuje na mogući drugi izvor širenja infekcije. Lokacija na kojoj su utvrđena serološki pozitivna goveda podržava hipotezu da seropozitivna goveda mogu biti indikator visoke aktivnosti virusa u određenim geografskim regionima. Savini i sar. (2012) su u ovom radu opisali sprovođenje programa monitoringa prisustva virusa Zapadnog Nila na teritoriji severne Italije. Ovaj program je sproveden tako što je najpre postavljena 61. CDC-CO₂ zamka u ruralnim i seoskim mestima u svih 11 provincija Veneto (49 zamki) i regiona *Friuli Venezia Giulia* (12 zamki). Zamke su bile postavljene od maja do oktobra i bile su aktivirane svakih 15 dana po jednu noć, od zalaska sunca do narednog jutra. Sakupljeni komarci su odmah stavljeni u frižider, odnošeni u laboratoriju, prebrojavani i identifikovani (Romi i sar., 1997; Severini i sar., 2009). Krajem septembra 2011. godine stanovnici ruralnih područja blizu mesta *Treviso*, opštine u regionu Veneto, primetili su neobično veliku pojavu uginuća gugutki i ptica drugih vrsta. Jedna uginula ptica je odneta u Institut u Padovi na ispitivanje. Izvršena je obdukcija i kao uzorci uzeti su mozak, jetra, bubreg, slezina, pluća i creva. Rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo virusa Zapadnog Nila u dostavljenim uzorcima koji su pripadali liniji 2 virusa u ovom delu Italije. Petrović i sar. (2013) su u cilju procene cirkulacije virusa Zapadnog Nila na teritoriji severne Srbije, ispitali uzorke poreklom od ukupno 133 divlje ptice (45 različitih vrsta ptica). Uzorci krvnih seruma ptica kao i zbirni uzorci tkiva su prikupljeni u periodu od januara do septembra 2012. godine na teritoriji Vojvodine i ispitani primenom metoda ELISA, testa redukcije plakova i *real-time* RT-PCR. Primenom metode ELISA prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je ustanovljeno kod 7 od ukupno 92 ispitana uzorka. Prvi put u Srbiji je primenom *real-time* RT-PCR detektovano prisustvo genoma virusa u uzorcima tkiva kod 8 od 81 ispitivane divlje ptice kao i u jednom uzorku krvnog seruma. Filogenetska analiza celog genoma jednog virusnog izolata i dela E regiona genoma ostalih utvrđenih virusa Zapadnog Nila u ovom ispitivanju je pokazala da su sojevi virusa poreklom iz Srbije slični sojevima virusa koji su izazivali infekcije kod ljudi i životinja u Grčkoj, Mađarskoj i Italiji. Chaskopoulou i sar. (2013) navode da je u Grčkoj, području centralne Makedonije, 2010. godine došlo do epidemije izazvane virusom Zapadnog Nila tokom koje je registrovano 197 slučajeva neuroinvazivne bolesti kod ljudi. Tokom 2011. godine sproveden je program monitoringa prisustva virusa kod komaraca i

sentinel pilića kod kojih je molekularnim metodama utvrđivano prisustvo virusa. Dobijeni rezultati ovih istraživanja su dokazali prisustvo virusa u populaciji pilića mesec dana pre pojave prvih slučajeva infekcije kod ljudi. Tokom ovog monitoringa utvrđeno je da je brojnost komaraca *C. pipiens* i *C. skromusi* bila velika na svim mestima gde je vršeno uzorkovanje. Dobijeni rezultati ispitivanja su ukazivali da je virulentni soj Nea Santa-Grčka-2010 virusa Zapadnog Nila koji je bio odgovoran za epidemiju 2010. godine, aktivno cirkulisao u populaciji pilića i komaraca i 2011. godine i da svi grčki izolati pripadaju posebnoj filogenetskoj grani virusa. Autori navode da filogenetska analiza kojom se utvrđuje međusobna srodnost između sojeva virusa ima izuzetan značaj u praćenju kretanja pojedinih sojeva virusa, identifikaciji njihove virulencije što olakšava procenu rizika za zdravlje ljudi na toj teritoriji. Kemenesi i sar. (2014) su vršili ispitivanje uzoraka komaraca koji su prikupljeni tokom 2013. godine u Srbiji, AP Vojvodina. Komarci su prikupljeni na 13 različitih lokaliteta. Utvrđeno je prisustvo virusa Zapadnog Nila kod dve vrste komaraca *Culex pipiens* i *Anopheles maculipennis*. Filogenetska analiza je pokazala da su sojevi virusa Zapadnog Nila poreklom iz Srbije najrodniji sojevima virusa identifikovanim u Italiji i Grčkoj tokom 2010. i 2012. godine. Opisana ispitivanja su izvršena primenom metode *real-time* RT-PCR. Sve do 2012. godine nije bilo podataka o cirkulaciji virusa Zapadnog Nila na teritoriji Alžira. U ispitivanjima koje su sproveli Lafri i sar. (2017) utvrđivana je seroprevalencija virusa Zapadnog Nila kod konja na teritoriji Alžira. Tokom 2014. godine ukupno je prikupljeno 293 uzoraka krvnog seruma ekvida (222 magarca i 71 konj). Životinje od kojih je vršeno prikupljanje uzoraka seruma nisu imale kliničke simptome bolesti i nisu bile vakcinisane protiv virusa Zapadnog Nila. Uzorci seruma su prikupljeni od životinja na tri lokacije u severoistočnom delu zemlje i ispitani primenom metode ELISA, odnosno da bi se izbegla unakrsna reakcija na druge flaviviruse, i primenom imunoblota i virus neutralizacije. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su antitela protiv virusa Zapadnog Nila bila prisutna u 51 uzorku seruma ekvida – 19 pozitivnih uzoraka konja i 32 uzorka magaraca. Ispitivanja su potvrdila da je kod sedam seronegativnih konja poreklom iz regiona Blida u centralnom delu Alžira, posle osam meseci boravka u severoistočnom regionu Alžira El Kalu, ustanovljena serokonverzija što je potvrdilo cirkulaciju virusa tokom 2014. godine u ovom području Alžira. Medić i sar. (2014) su u periodu od 2007. do 2011. godine ukupno prikupili 252 uzorka krvnog seruma konja poreklom sa sedam različitih lokacija u severnoj Srbiji. Uzorci krvnog seruma su ispitani primenom metode ELISA. Odabrani pozitivni uzorci seruma su ispitani i primenom testa redukcije plakova. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je kod 28,6% od 252 uzorka krvnog seruma ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Kao što je prethodno navedeno, u odabranim uzorcima seruma utvrđeni su titri antitela koji su se kretali od 1:23 do više od 1:512. Ova ispitivanja su potvrdila cirkulaciju virusa u severnoj Srbiji. Prisustvo virusa Zapadnog Nila na teritoriji Italije je bila tema kojom su se bavili Bellini i sar. (2014). Od 2009. godine na teritoriji regiona *Emilia Romagna* u Italiji uspostavljen je integrisan sistem monitoringa prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca, ptica i kod ljudi. Cilj uvođenja ovog programa je bio da se dobiju podaci o cirkulaciji virusa na navedenoj teritoriji kao i da se smanji mogućnost prenošenja infekcije kod ljudi putem krvi, odnosno donacijama organa i tkiva. Do 2013. godine ovaj integrisani sistem monitoringa dao je zadovoljavajuće rezultate u smislu da je detekcija virusa bila potvrđena 3 do 4 nedelje pre pojave bolesti kod ljudi (neuroinvanzivni sojevi virusa), zatim u smislu prostorne distribucije virusa i u smislu osetljivosti odnosno kapaciteta da

se detektuje cirkulacija virusa. Dobijeni rezultati ovog monitoringa su utvrdili značajnu korelaciju između prisustva virusa kod vektora i broja obolelih ljudi registrovanih na nivou regije u kojoj je sistem uspostavljen. Escribano-Romero i sar. (2015) navode da se virus Zapadnog Nila u prirodi održava u ciklusu između ptica i komaraca. Virus inficira ljude i konje i kod njih izaziva kliničke simptome i promene u nervnom sistemu. U Srbiji je virus Zapadnog Nila prvi put identifikovan 2010. godine kod komaraca. U toku 2012. godine virus Zapadnog Nila je izazvao infekciju kod ljudi (300 potvrđenih slučajeva), dok je 2013. godine izazvao 35 smrtnih ishoda kod ljudi. U ovim ispitivanjima 688 uzoraka poreklom od 279 farmskih svinja, 318 divljih svinja i 91 srna je ispitano na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA i virus neutralizacionog testa. Specifičnost metode je ispitana korišćenjem Usutu virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je kod 43 (15,4%) svinje, 56 (17,6%) divljih svinja i 17 (18,7%) srna utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA. Od ovog broja 6 (14%) uzoraka svinja, 33 (59%) uzoraka divljih svinja i 4 (23,5%) uzorka poreklom od srna je bilo pozitivno primenom virus neutralizacionog testa na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Svi ovi podaci potvrđuju cirkulaciju oba flavivirusa u Srbiji i ističu potrebu za implementacijom monitoring programa u regionu jugoistoka Evrope. Gladinis i sar. (2015) su ispitivali uzorke krvnog seruma goveda koji su bili prikupljeni sa klanica raspoređenih u četiri različita regiona Grčke. Prikupljeni uzorci krvnog seruma su zatim ispitivani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, *Anaplasma ovis* i *Leishmania infantum* primenom metode ELISA. U dva od ukupno četiri regiona u Grčkoj gde je vršeno prikupljanje uzoraka bilo registrovanih slučajeva groznice Zapadnog Nila kod ljudi. Od ukupno 156 ispitanih uzoraka krvnog seruma goveda, 30 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, a 55 uzoraka na prisustvo antitela protiv *Anaplasma ovis*. Svi ispitani uzorci krvnog seruma goveda su bili negativni na prisustvo specifičnih antitela protiv *L. infantum*. U dva regiona od ukupno četiri u kojima su vršena ispitivanja i gde je bilo registrovanih slučajeva oboljenja ljudi utvrđeno je prisustvo životinja pozitivnih na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Dinu i sar. (2015) navode da je linija 2 virusa Zapadnog Nila prisutna u podsaharskoj Africi i Madagaskaru, a od 2004. godine je registrovana u Mađarskoj. Ova linija virusa se u poslednjoj deceniji proširila u celoj Evropi. Posle izbijanja epidemije izazvane linijom 1 virusa Zapadnog Nila na teritoriji Rumunije 1996. godine, tokom svake naredne godine u sezoni aktivnosti virusa, utvrđeni su slučajevi pojave obolelih ljudi sa kliničkim simptomima poremećaja nevnog sistema. Groznica Zapadnog Nila je utvrđena i u 2010. godini i bila je izazvana linijom 2 virusa. U ovim istraživanjima su ispitani uzorci krvnog seruma ljudi sa neuroinvazivnim simptomima oboljenja kao i uzorci komaraca. Uzorci su prikupljeni sa područja jugoistočne Rumunije u periodu od 2011. do 2013. godine. Svi prikupljeni uzorci su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila. Pozitivni uzorci virusa su sekvencirani i izvršena je filogenetska analiza. Sojevi virusa Zapadnog Nila detektovani u uzorcima poreklom od ljudi i komaraca su pokazali da imaju 99% sličnosti sa sojem Volgograd 2007 koji pripada liniji 2 virusa. Istovremeno, navedeni sojevi virusa su se razlikovali od drugih sojeva virusa prethodno detektovanih u centralnoj i južnoj Evropi.

U ispitivanjima Davoust i sar. (2016), koja su vršena na teritoriji Senegala, odnosno na području severozapadnog dela zemlje (tri lokaliteta u ovom delu zemlje blizu *Keur Momar Sarr*), primenom metode ELISA izvršeno je ispitivanje 283 uzorka

krvnog seruma životinja (136 uzoraka krvnog seruma ovaca, 64 uzorka krvnog seruma konja, 29 uzoraka krvnog seruma magaraca, 29 uzoraka krvnog seruma koza, 14 uzoraka krvnog seruma goveda i 11 uzoraka krvnog seruma pasa). Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je kod 86,2% uzoraka krvnog seruma magaraca ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ukupno 68,7% ispitanih uzoraka krvnog seruma konja, zatim 27,3% uzoraka poreklom od pasa, odnosno 6% uzoraka krvnog seruma koza je takođe bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv ovog virusa. U uzorcima krvnog seruma goveda i ovaca nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su konji, magarci (ekvidi) i psi pogodne sentinel životinje za monitoring infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, autori su zaključili da preživari nemaju značajniju ulogu u epizootiji koju je izazvao ovaj virus.

Chaskopoulou i sar. (2016) iznose bitne podatke o kretanju virusa na teritoriji Italije, Francuske, Srbije i Grčke. Tako je 2009. godine u Italiji bilo prijavljeno 18 slučajeva groznice Zapadnog Nila kod ljudi, zatim 2010. godine 83 slučaja, 2011. godine 14 slučajeva, 2012. godine 50 slučajeva, 2013. godine 69 slučajeva, a 2014. godine 24 slučaja oboljenja. Slučajevi pojave oboljenja su bili prijavljeni u ravničarskim krajevima *Bologna*, *Modena* i provincije *Reggio Emilia*. Navedena područja Italije su uglavnom ruralna sa nekoliko gradskih centara, sa ukupno oko 2,2 miliona stanovnika. U Francuskoj je oboljenje utvrđeno kod ljudi i konja u više navrata i to 1962. godine i 1966. godine, zatim 1970. godine, odnosno kod konja 2000. godine (76 obolelih). Groznica Zapadnog Nila je utvrđena kod konja i 2003. godine sa ukupno 5 obolelih, 2004. godine sa 32 obolele životinje i 2006. godine sa 5 obolelih grla. Kod ljudi je tokom 2003. godine u Francuskoj utvrđeno sedam slučajeva oboljenja. Tokom 2015. godine na teritoriji Francuske je utvrđeno 30 pozitivnih konja na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ovde treba napomenuti da deltu reke Rone, u kojoj su vršena ispitivanja, karakteriše mediteranska klima sa veoma toplim i suvim letima i kišovitom jeseni, dok su zime uglavnom blage i vlažne. U Srbiji je groznica Zapadnog Nila prvi put registrovana 1972. godine. Kod komaraca je virus na teritoriji Srbije prvi put detektovan iz uzoraka prikupljenih u okolini Novog Sada 2010. godine. Od 2012. godine i dalje na teritoriji Srbije su zabeleženi slučajevi oboljevanja ljudi. Tako je oboljenje ustanovljeno kod ljudi 2012. godine (71 slučaj uključujući devet smrtnih slučajeva), 2013. godine (303 slučaja, 35 smrtnih slučajeva), 2014. godine (76 slučajeva, 9 smrtnih slučajeva) i 2015. godine (5 slučajeva, 1 smrtni ishod). Ovde treba naglasiti da je po broju stanovnika Novi Sad u Srbiji treći grad po veličini koji se nalazi u južnom delu Panonske nizije, na obalama reke Dunav. Karakteriše ga umereno kontinentalna klima sa prosečnom temperaturom u toku januara od $-0,2^{\circ}\text{C}$, obično kratkotrajno i kišovito proleće, dok leto počinje naglo i ima prosečnu temperaturu u julu od oko 21°C .

U 2010. godini, Grčka je prvi put zabeležila epidemiju Zapadnog Nila koja je po broju obolelih u poslednje dve decenije bila druga po veličini u Evropi. Oboljenje utvrđeno kod 262 ljudi od kojih je 35 umrlo. Prisustvo virusa Zapadnog Nila, linije 2, je bilo utvrđeno kod ljudi, sentinel pilića, divljih ptica i *Culex* komaraca. Bolest se javljala i u naredne tri godine sve do 2013. godine zahvaljujući preživljavanju virusa što je dovelo do 600 potvrđenih infekcija ljudi i 70 smrtnih slučajeva. U regionu Grčke gde je došlo do oboljevanja ljudi ima dosta močvara, reka i pirinčanih polja. Rečne delte su staništa za ptice selice i domaće ptice. Klima u regionu je uglavnom umereno topla sa

hladnim, kišnim zimama i toplim, vlažnim letima što pogoduje distribuciji virusa. Maquart i sar. (2016) su u pokušali da utvrde da li pojedine vrste životinja mogu poslužiti kao sentinel vrste koje bi se koristile za praćenje infekcije životinja izazvane virusom Zapadnog Nila. Ispitivanja su vršena u dva regiona na ostrvu Madagaskar (*Antsalova* i *Mitsinjo*). Istovremeno je praćena i pojava infekcije kod ljudi. Dva regiona u kojima su vršena ispitivanja su smeštena u neposrednoj blizini jezera na kojem koegzistiraju domaća živina, migratorne ptice i ljudi. Serološkim ispitivanjem uzorka krvnog seruma domaće živine (patke, kokoši, guske, ćurke) primenom metode ELISA utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 29,4% uzoraka životinja poreklom iz regiona *Antsalova*, odnosno kod 16,7% uzoraka životinja poreklom iz regiona *Mitsinjo*. Primenom metode RT-PCR ustanovljeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila kod osam zbirnih uzoraka komaraca i kod jednog uzorka kokoši. Ovde se posebno ističe podatak da je nukleinska kiselina virusa utvrđena kod dve vrste komaraca *Aedeomyia madagascariensis* i *Anopheles pauliani* koji nisu ranije opisivani kao vektori virusa. Svi identifikovani sojevi virusa pripadali su liniji 2 koja je uglavnom prisutna na teritoriji Afrike, a bili su srodni sa Malagasi sojem virusa izolovanim 1988. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da virus Zapadnog Nila cirkuliše među domaćom živinom i komarcima na ostrvu *Madagaskar* i ukazali na potrebu ispitivanja uzoraka poreklom od živine u cilju monitoringa virusa Zapadnog Nila.

Gossner i sar. (2017) navode da je infekcija ljudi izazvana virusom Zapadnog Nila na teritoriji Austrije otkrivena serološkim metodama 2009. godine u dva slučaja i 2010. godine kod jednog pacijenta. Tokom 2014. godine još dve osobe su bile inficirane virusom Zapadnog Nila da bi zatim usledilo osam slučajeva pojave oboljenja kod ljudi u 2015. godini. Pored ljudi, prisustvo virusa Zapadnog Nila je ustanovljeno u Austriji kod ptica i komaraca. Nema dokaza o infekciji ljudi i konja na teritoriji Francuske u periodu od sredine 1960-ih do 2000. godine. Prvu epizootiju izazvanu virusom Zapadnog Nila 2000. godine kod kopitara u Francuskoj nisu pratila masovna uginuća ptica. Sedam slučajeva oboljenja izazvanog virusom Zapadnog Nila u Francuskoj kod ljudi je prijavljeno 2003. godine, a zatim do 2015. godine nije registrovan ni nijedan slučaj. Međutim, tokom leta 2015. godine infekcija konja i ljudi izazvana virusom Zapadnog Nila se ponovo pojavila u regionu *Camargue* u Francuskoj izazivajući oboljenje kod konja i jedan slučaj oboljenja kod ljudi. Na severoistoku Italije virus Zapadnog Nila je u periodu od 2010. godine do 2015. godine izolovan iz uzoraka komaraca, ptica, kopitara i ljudi. U istom periodu potvrđeni su slučajevi oboljevanja kod ljudi, ukupno 148 slučajeva, u osam od 20 regiona u Italiji. Tokom ovog perioda kod konja i sentinel živine je utvrđivana pojava serokonverzije u močvarnim područjima Sicilije. Velika Britanija nije imala registrovane slučajeve groznice Zapadnog Nila kod ljudi ili životinja u periodu 2010. – 2015. godine. Istraživanja Cardinale i sar. (2017) imala su za cilj utvrđivanje prisustva virusa Zapadnog Nila na teritorijama koje se nalaze u jugozapadnom delu Indijskog okeana. Tokom 2010. godine izvršeno je prikupljanje uzoraka krvnog seruma od ukupno 303 konja poreklom sa Madagaskara, Mauricijusa, Sejšela i Rejuniona koji su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA. Pozitivni uzorci seruma su zatim ispitani primenom testa redukcije plakova. Najveću prevalenciju prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila imali su konji koji su bili poreklom sa Madagaskara i ona je iznosila 46,2%. Starost i poreklo životinja koje su ispitane su bile povezane sa rizikom od infekcije: što su grla bila starija imala su viši rizik od infekcije. Ova

ispitivanja su prva ispitivanja seroprevalencije infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila u Indijskom okeanu, a rezultati ukazuju na potencijalni rizik za inficiranje ljudi i drugih vrsta životinja. U ovim ispitivanjima nije bilo ustanovljeno prisustvo Usutu virusa niti virusa Japanskog encefalitisa u ispitivanoj populaciji konja. Bolfa i sar. (2017) su ispitivali prevalenciju prisustva antitela u uzorcima krvnog seruma konja i magaraca protiv virusa Zapadnog Nila, herpesvirusa 1 i 4 konja, influence konja, virusnog arteritisa konja i infektivne anemije kopitara. Ukupno je prikupljeno 140 uzoraka seruma konja i 40 uzoraka seruma magaraca sa područja Karipskih ostrva-*Sz. Kitts, Nevis* i *Sint Eustatius* u periodu od 2006. do 2015. godine. Prikupljeni uzorci su ispitani primenom metoda ELISA i virus neutralizacije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 25 uzoraka konja, dok su tri uzorka bila u zoni sumnjivih. Prisustvo antitela protiv virusa EHV 1 je utvrđeno kod 41 konja u starosti od 6,7 godina. Na prisustvo antitela protiv virusa EHV 4 je bilo pozitivno 138 konja, a na prisustvo antitela protiv influence konja 49 konja. U ispitivanim uzorcima seruma nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv infektivne anemije kopitara, dok je jedan serum bio pozitivan primenom metode ELISA na virusni arteritis, a virus neutralizacionim testom negativan na prisustvo antitela. Ovo su prva ispitivanja koja su dokazala prisustvo virusa Zapadnog Nila na ovom području. Prisustvo antitela protiv navedenih virusa utvrđeno u krvi kako domaćih, tako i grla iz uvoza. Podatke koji se odnose na sprovođenje programa monitoringa vezanih za virus Zapadnog Nila predstavljeni su od strane Petrić i sar. (2017). Autori navode da su programi monitoringa virusa Zapadnog Nila u AP Vojvodini započeti kod ljudi i komaraca 2005. godine, kod konja 2009. godine i divljih ptica 2012. godine. Dobijeni podaci koji se odnose na cirkulaciju virusa Zapadnog Nila kod životinja i ljudi na teritoriji AP Vojvodine su omogućili implementaciju nacionalnog monitoring programa u koji su bili uključeni komarci, konji i ptice tokom 2014. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali korelaciju između prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca i infekcije kod ljudi tokom 2014. godine, odnosno prisustva infekcije kod ljudi i prisustva virusa kod divljih ptica i komaraca tokom 2015. godine. Prisustvo virusa Zapadnog Nila je utvrđeno kod komaraca prikupljenih sa 43 različite lokacije za prikupljanje koje su bile raspoređene širom Vojvodine. Dobijeni rezultati su ukazali na neophodnost stalnog unapređivanja programa monitoringa prisustva virusa Zapadnog Nila na jednoj teritoriji, a u cilju sprovođenja adekvatnih mera kontrole i unapređenja preventivnih zdravstvenih mera kod ljudi. Rezultati monitoring programa infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila sprovedenog na teritoriji Srbije tokom 2014. godine i 2015. godine koji su objavljeni od strane Petrović i sar. (2018) dokazuju da je intenzivna cirkulacija virusa Zapadnog Nila među sentinel životinjama (živina i konji), divljim pticama i komarcima na teritoriji sedam okruga u AP Vojvodini i na teritoriji Grada Beograda. U periodu od juna do avgusta 2014. godine u Srbiji je prikupljeno 2020 uzoraka krvnog seruma od 752 sentinel konja, a serokonverzija je utvrđena kod 2,57% uzoraka i 6,91% sentinel konja. Od ukupno ispitanih 3809 uzoraka krvnog seruma pilića prikupljenih od juna do septembra 2014. godine, serokonverzija je ustanovljena kod 5,75% uzoraka. Pored navedenih rezultata u ovom radu su prikazani i rezultati programa monitoringa infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila koji je sproveden 2015. godine. Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo virusa na našoj teritoriji kao endemske infekcije koja predstavlja značajan problem u humanoj i veterinarskoj medicini. Dorko i sar. (2018) su primenom metode ELISA ukupno ispitali 464 uzorka krvnog seruma ljudi poreklom sa teritorije Istočne Slovačke na prisustvo specifičnih

antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Svi pozitivni uzorci seruma su zatim testom virus neutralizacije ispitani na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila i Usutu virusa. Dobijeni rezultati su potvrdili prisustvo antitela kod tri uzorka seruma. Jedna 29-godišnja osoba ženskog pola koja se bavila čuvanjem stoke je bila višekratno izložena ubodima komaraca. Druge dve osobe ženskog pola (61 i 76 godina starosti) u čijim uzorcima krvnog seruma su takođe utvrđena antitela protiv virusa Zapadnog Nila su bile lečene od pareze gornjih ekstremiteta. Obe žene su takođe bile izložene višekratnim ubodima komaraca. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja autori su zaključili da iako nema zvaničnih dokaza o prisustvu infekcije ljudi i životinja izazvanih virusom Zapadnog Nila na teritoriji Slovačke, neophodno je kontinuirano sprovođenje odgovarajuće programe monitoringa ptica, konja i komaraca kao glavnih domaćina i prenosioca ove infekcije. Autori su naglasili neophodnost sprovođenja odgovarajućih monitoring programa infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila i Usutu virusom na teritoriji Slovačke, ali i u drugim zemljama Evrope. Medić i sar. (2019) su tokom jula 2018. godine utvrdili prvi slučaj infekcije virusom Zapadnog Nila praćen neurološkim kliničkim simptomima prijavljen kod kobile rase Belgijski sportski konj u Beogradu, Republika Srbija. Kod obolele životinje utvrđena je pojava dezorijentacije, opšte slabosti, ataksije i gubitka ravnoteže. Primenom metode ELISA je u uzorku krvnog seruma obolele kobile utvrđena pojava IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ovi rezultati su potvrđeni i primenom virus neutralizacionog testa. Sedam dana nakon pojave oboljenja, delovi nukleinske kiseline virusa u uzorcima poreklom od obolele životinje nisu mogli da se dokažu. Zdravstveno stanje obolelog konja klinički se poboljšalo nakon dve nedelje, dok su ostali konji iz zajedničkih prostorija bili bez vidljivih kliničkih simptoma oboljenja. Čobanova i sar. (2019) navode da monitoring prisustva virusa Zapadnog Nila i Usutu virusa danas na teritoriji Evropske Unije ima prednost u odnosu na ostale vektorski prenosive bolesti. U ovom radu su objavljeni podaci o prevalenciji virusa Zapadnog Nila od 0,46% (linija 2 virusa), odnosno Usutu virusa (Evropa 2) od 0,25% kod komaraca prisutnih na teritoriji jugozapadne Slovačke. Na osnovu dobijenih rezultata sprovedenih ispitivanja autori naglašavaju neophodnost sprovođenja rigoroznih programa monitoringa prisustva prethodno navedenih virusa kod ptica, komaraca, konja i ljudi na teritoriji cele Slovačke. Michel i sar. (2019) smatraju da divlje ptice imaju značajnu ulogu kao rezervoari i vektori arbovirusnih zoonoza. Usutu virus je enzootski prisutan na teritoriji Nemačke od 2011. godine, virus Zapadnog Nila od 2018. godine kada je prvi put utvrđeno njegovo prisustvo kod nekoliko vrsta ptica i kod konja. Tokom 2017. i 2018. godine primenom *real-time* RT-PCR i serološki, ispitano je ukupno 1709 uzoraka živih divljih ptica i ptica iz zoo vrtova. Pored ovoga, tokom 2017. godine ispitani su i uzorci organa uginulih ptica. Kod 57 uzoraka krvnog seruma živih ptica i 100 uzoraka organa uginulih ptica bilo je utvrđeno prisustvo nukleinske kiseline Usutu virusa. Prisustvo virusa Zapadnog Nila nije bilo ustanovljeno. Dobijeni rezultati seroloških ispitivanja su potvrdili prisustvo specifičnih antitela protiv Usutu virusa. Prevalencija prisustva ove infekcije kod divljih ptica u istočnoj Nemačkoj je bila visoka tokom 2017. i 2018. godine. U severnoj Nemačkoj je Usutu virus prvi put ustanovljen 2018. godine. Kod sedentarnih ptica na teritoriji istočne Nemačke i migratornih ptica na navedenom području tokom 2018. godine je utvrđena lokalna cirkulacija virusa Zapadnog Nila. Amdoni i sar. (2019) su ispitali uzorke poreklom od tri sentinel jata živine koja su smeštena u tri različita enzootska regiona virusa Zapadnog Nila na teritoriji Tunisa. Sva tri jata su praćena od septembra 2016. do januara 2017. godine. Ukupno je ispitano 442 uzoraka krvnog

seruma poreklom od živine smeštene na severu Tunisa, 392 uzorka krvnog seruma kokoši smeštene na istočnoj obali Tunisa i 386 uzorka poreklom od kokoši smeštene u Južnom delu Tunisa. Svi uzorci krvnog seruma su ispitani primenom metode ELISA na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Kod 10,7 % uzoraka krvnog seruma živine smeštene u severnom delu Tunisa utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Sličan rezultat je dobijen ispitivanjima uzoraka poreklom od živine smeštene na jugu Tunisa (9,8 % pozitivnih uzoraka). Nijedan pozitivan uzorak krvnog seruma nije utvrđen kod živine koja je bila smeštena na istočnoj obali Tunisa. Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila je utvrđeno kod dve kokoši poreklom sa severa Tunisa. Filogenetskom analizom je ustanovljeno da sojevi virusa poreklom iz Tunisa pripadaju liniji 1 virusa Zapadnog Nila i da su blisko srodni sa italijanskim sojevima virusa čije je prisustvo otkriveno kod komaraca tokom 2016. godine i kod uzoraka poreklom od ptice vrste kobac tokom 2017. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju na to da se kokoši i divlje ptice moraju uzeti u obzir kao sentinel vrste za praćenje kretanja infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila, odnosno da moraju biti uključene kao sentinel vrste kod izrade programa monitoringa ove infekcije životinja.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ispitivanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita svrsishodnost postojećeg programa nadzora virusa Zapadnog Nila kao sistema ranog upozoravanja („*early warning system*“) i utvrdi prostorna i vremenska korelacija nalaza proisteklih iz postojećeg sistema monitoringa u odnosu na pojavu bolesti kod ljudi, kao i da se ispita mogućnost korišćenja goveda, svinja i živine kao sentinel vrsta životinja za efektivniji nadzor groznice Zapadnog Nila.

Za ostvarivanje postavljenog cilja, definisani su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje prisustva delova genoma virusa Zapadnog Nila kod komaraca primenom metode *real-time* RT-PCR na epizootiološkom području Južnog Banata u periodu 2017- 2018. godina.
2. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma konja na prisustvo specifičnih IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom ELISA metode na epizootiološkom području Južnog Banata u periodu 2017-2018. godina.
3. Ispitivanje prisustva delova genoma virusa Zapadnog Nila kod divljih ptica iz redovnog monitoringa primenom metode *real-time* RT-PCR na epizootiološkom području Južnog Banata u periodu 2017-2018. godina.
4. Analiza korelacija između prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca, seropozitivnih konja i divljih ptica na epizootiološkom području Južnog Banata u periodu 2017 i 2018. godine kao i prostorna i vremenska korelacija u odnosu na pojavu bolesti kod ljudi.
5. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma goveda sa odabranih farmi na teritoriji Južnog Banata, u periodu od 2018. do 2019. godine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom ELISA metode.
6. Ispitivanje dužine trajanja maternalnog imuniteta dvokratnim ispitivanjem krvi od teladi otehlenih u periodu mart-jun 2019. godine primenom ELISA metode.
7. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma svinja prikupljenih sa odabranih farmi i gazdinstava na teritoriji Južnog Banata, tokom 2018. godine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom ELISA metode.
8. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma živine prikupljenih sa odabranih farmi i gazdinstava na teritoriji Južnog Banata, tokom 2018. godine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom ELISA metode.
9. Statistička analiza dobijenih rezultata.
10. Definisavanje i analiza prostorne i vremenske distribucije vektora pozitivnih na prisustvo virusa Zapadnog Nila i seropozitivnih potencijalnih sentinel vrsta životinja, kao i prostorna i vremenska korelacija u odnosu na pojavu bolesti kod ljudi.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Uzorci komaraca, organa divljih ptica i krvnog seruma

Kao materijal u ovom istraživanju korišćeno je 140 zbirnih uzoraka komaraca i to isključivo vrste *Culex pipiens pipiens* i *Culex pipiens modestus* koji su prikupljeni sa teritorija više opština Južnobanatskog okruga, AP Vojvodina, Republika Srbija. Uzorkovanje komaraca vršeno je na unapred utvrđenim mestima na kojima su postavljane klopke za hvatanje komaraca. Prikupljanje uzoraka komaraca sprovedeno je u skladu sa Uputstvom i planom za sprovođenje monitoringa virusa Zapadnog Nila na teritoriji Republike Srbije, koji je podrazumevao da se na 10 lokaliteta vrši prikupljanje zbirnih uzoraka komaraca, i sprovodio se u skladu sa odgovarajućim zakonskim propisima donetim od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Republike Srbije. Prikupljanje komaraca je vršeno u periodu njihove najveće aktivnosti, ukupno 4 uzorkovanja po lokalitetu i to prvo uzorkovanje u periodu druga polovina juna, dva uzorkovanja u julu (početkom i krajem jula) i četvrto uzorkovanje polovinom avgusta.

Sa teritorije Južnobanatskog okruga prikupljeno je 319 uzoraka krvnog seruma konja. Pre uzorkovanja ispitano je zdravstveno stanje konja od kojih je vršeno prikupljanje uzoraka krvnog seruma. Prikupljanje uzoraka krvi od konja vršeno je u skladu sa Uputstvom i planom monitoringa virusa Zapadnog Nila na teritoriji Republike Srbije, a koji je podrazumevao da se na Južnobanatskom okrugu izvrši serološko ispitivanje do 40 uzoraka krvnog seruma konja sa što više lokacija i sprovodio se u skladu sa odgovarajućim zakonskim propisima donetim od strane Uprave za veterinu Republike Srbije. Uzorkovanje i ispitivanje se vršilo sukcesivno tokom četiri meseca: juna, jula, avgusta i septembra, kada je najveća aktivnost vektora virusa, a da pri tom nije bilo nephodno vršiti testiranje istih životinja.

Pored navedenih uzoraka u ovim istraživanjima su za ispitivanja korišćeno je ukupno 76 uzoraka organa (slezina, pluća, bubreg) i tkiva (mozak) uginulih divljih ptica kao i briseva farinksa poreklom od divljih ptica prikupljenih sa teritorije Južnobanatskog okruga, Republika Srbija. Prikupljanje leševa uginulih divljih ptica i briseva farinksa vršeno je u skladu sa Uputstvom i Planom monitoringa virusa Zapadnog Nila na teritoriji Republike Srbije, a koji se sprovodio u skladu sa odgovarajućim zakonskim propisima donetim od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. Plan je podrazumevao da se uginule ptice, naročito sedentarne, i to naročito prijemčive za infekciju virusom Zapadnog Nila, kao što su vrane, svrake, ptice grabljivice jastrebovi, sokolovi, orlovi i ptice pevačice ispitaju na prisustvo virusa Zapadnog Nila. Prikupljanje uzoraka uginulih ptica na teritoriji Južnobanatskog okruga bilo je moguće u toku cele godine.

Kao materijal za ispitivanje korišćeno je 105 uzoraka krvnog seruma goveda prikupljenih sa farmi na teritoriji Južnobanatskog okruga koji nisu bili obuhvaćeni Uputstvom, i Planom monitoringa groznice Zapadnog Nila Uprave za veterinu. Farme

sa kojih je vršeno prikupljanje uzoraka se nalaze u neposrednoj blizini prirodnih vodotokova i u njima se gaji više proizvodnih kategorija životinja. Od teladi u starosti do tri i pet meseci, poreklom sa ovih farmi, prikupljeno je ukupno 63 uzoraka krvnog seruma u cilju utvrđivanja prisustva maternalnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kao i perioda do kojeg perzistiraju, odnosno do kojeg se mogu detektovati kod teladi.

Kao materijal za ispitivanje korišćeni su i uzorci 124 krvnog seruma svinja koji nisu bili obuhvaćeni Uputstvom, i Planom monitoringa groznice Zapadnog Nila Uprave za veterinu. Šezdeset dva uzorka je prikupljeno sa klanica koje se nalaze na teritoriji Južnobanatskog okruga. Pored ovoga, izvršeno je prikupljanje 62 uzoraka krvnog seruma svinja koje su gajene i zaklane u individualnim gazdinstvima.

U istraživanjima su ispitani 125 uzoraka krvnog seruma živine koja se gajila na komercijalnim farmama brojlerskih pilića i koka nosilja kao i živine gajene u individualnim gazdinstvima na teritoriji Južnobanatskog okruga koji nisu bili obuhvaćeni Uputstvom, i Planom monitoringa groznice Zapadnog Nila Uprave za veterinu.

4.1.2. Izveštaji Zavoda za javno zdravlje Pančevo po pitanju groznice Zapadnog Nila kod ljudi

Kao materijal za statističko analiziranje i upoređivanje podataka o prisustvu infekcije izazvane virusom groznice Zapadnog Nila kod ljudi i životinja, odnosno definisanje prostorne i vremenske distribucije vektora pozitivnih na prisustvo pomenutog virusa i seropozitivnih potencijalnih sentinel vrsta životinja u odnosu na prostornu i vremensku korelaciju pojave bolesti kod ljudi, korišćeni su izveštaji Zavoda za javno zdravlje Pančevo iz Pančeva. Centar za prevenciju i kontrolu bolesti Zavoda za javno zdravlje Pančevo na osnovu Pravilnika o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza, dostavljao je informacije o pacijentima koji su oboleli od virusa Zapadnog Nila sa teritorije Južnobanatskog okruga.

4.1.3. Dijagnostičko sredstvo za izvođenje metode ELISA

Ispitivanje prisustva specifičnih IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima krvnog seruma konja vršeno je primenom metode ELISA uz korišćenje komercijalnog dijagnostičkog sredstva INGEZIM West Nile IgM, proizvođača INGENASA, Madrid, Španija.

Za izvođenje metode ELISA u cilju dokazivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima krvnog seruma goveda, svinja i živine korišćeno je komercijalno dijagnostičko sredstvo INGEZIM West Nile Compac, proizvođača INGENASA, Madrid, Španija.

Korićena laboratorijska oprema i pribor za izvođenje metode ELISA

Laboratorijski pribor:

- laboratorijske menzure od 100 i 500 ml
- PVC rezervoari za rastvore za pipetiranje višekanalnim pipetama
- nastavci za mikropipete različitih zapremina (10, 100, 300, 1000 i 5000 µl)
- adhezivne folije za lepljenje ploča
- kese za otpadni materijal
- papirna vata

- laboratorijski flomaster

Oprema

- ELISA čitač Multiskan RC, Labsystems, Finska
- Inkubator Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Nemačka
- jednokanalne mikropipete varijabilnog volumena (0,5-10, 10-100, 30-300, 100-1000 i 1000-5000 μ l), Eppendorf, Nemačka
- višekanalne mikropipete varijabilnog volumena (10-100 i 30-300 μ l), Eppendorf, Nemačka
- centrifuga za epruvete 10 ml MPW-351 R, MPW med. instruments, Poljska
- laboratorijski sat
- frižider
- zamrzivač -20°C

Korišćeni reagensi

- komercijalni kit INGEZIM West Nile IgM, proizvođača INGENASA, Madrid, Španija
- komercijalni kit INGEZIM West Nile Compac, proizvođača INGENASA, Madrid, Španija
- destilovana voda

4.1.4. Materijal za izvođenje metode *real-time* RT-PCR

Za izvođenje metode *real-time* RT-PCR (*TaqMan* reakcija) – multipleks format korišćen je komercijalni kit "RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System", proizvođača „Invitrogen – Life Technologies“.

Korišćena laboratorijska oprema i pribor za izvođenje metode *real time* RT-PCR

Laboratorijski pribor:

- mikrotube 1,5 ml, PCR čiste
- PCR čisti nastavci i nastavci sa filterom za mikropipete različitih zapremina (10, 100, 300 i 1000 μ l)
- PCR *Cooler* (ploča za održavanje niske temperature uzorka u mikropločama)
- laboratorijske čaše od 500 i 1000 ml
- rukavice (nitril) PCR čiste
- stalci za mikrotube od 1,5 ml
- real time PCR ploče sa 96 bazenčića (optical *real-time* PCR plate)
- adhezivne folije za lepljenje ploča
- kese za otpadni materijal
- papirna vata
- laboratorijski flomaster

Oprema:

- laminarna komora – BSL2 nivo biosigurnosti
- PCR komora za pripremu reagenasa master miksa
- jednokanalne mikropipete varijabilnog volumena (0,5-10, 2-200, 30-300 i 50-1000 μ l) (Eppendorf)
- centrifuga sa hlađenjem na 4°C (14000 rpm) za mikrotube 1,5 (Eppendorf)
- centrifuga za mikrotube 1,5 i 0,2 „Mini Spin“ (Eppendorf)
- vorteks “REAX top” („Heidolph“)

- thermocycler: „7500 Real Time PCR System“ (AppliedBiosystem)
- laboratorijski sat
- kombinovani frižider-zamrzivač
- zamrzivači -20°C i -70°C

Korišćeni reagensi

- TRIzol® Reagent (U.S. PatentNo.5,346,994) proizvođača „Invitrogen Life Technologies“;
- Chloroform (99%) for molecular biology;
- Isopropanol (99%) for molecular biology;
- 75% Ethanol (u DEPC tretiranoj vodi);
- DEPC (diethylpyrocarbonate) tretirana ili PCR čista voda
- komercijalni kit "RNA UltraSense™ One-StepQuantitative RT-PCR System" (Invitrogen -Life Technologies)
- Prajmer forward: WNproC-F 10 (5'-CCTGTGTGAGCTGACAAACTTAGT-3')
- Prajmer reverse: WNproC-R 153 (5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3')
- TaqMan proba: WNproC-probe (5'-FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-TAMRA-3')
- pozitivna kontrola – uzorak estrahovane RNK iz 10% supernatanta obrađenog tkiva/organa ptice pripremljenog za izolaciju virusa i veštački kontaminiranog sa 1000 TCID₅₀/1 mL referentnog virusa WNV linije 1 - New York 99 (NY99), dobijenog iz laboratorije INIA, Madrid i umnoženog na kulturi ćelija RK-13 i/ili uzorak estrahovane RNK iz 10% supernatanta obrađenog tkiva/organa ptice pripremljenog za izolaciju virusa i veštački kontaminiranog sa 1000 TCID₅₀ /1 mL izolata WNV linije 2: KC407673 SRB-Noví Sad/12.

4.2. METODE RADA

4.2.1. ELISA

Izvođenje metode ELISA u cilju utvrđivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima krvnog seruma konja, goveda, svinja i živine primenom komercijalnog dijagnostičkog kita, vršeno je prema proceduri propisanoj od strane proizvođača. Spektrofotometrijsko očitavanje dobijenih rezultata vršeno je primenom optičkog filtera talasne dužine od 450 nm, a dobijene vrednosti optičke gustine su preračunavane primenom odgovarajuće formule. Na ovaj način dobijene pojedinačne vrednosti za svaki uzorak krvnog seruma očitavaju se kao pozitivne ili negativne vrednosti, odnosno kao pozitivni ili negativni uzorci na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela u krvnom serumu protiv virusa Zapadnog Nila korišćeni su komercijalni ELISA dijagnostički kitovi. Za utvrđivanje specifičnih IgM antitela u uzorcima krvnog seruma konja korišćen je komercijalni kit INGEZIM West Nile IgM proizvođača „Ingenasa“, dok je za utvrđivanje specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma goveda, svinja i živine korišćen komercijalni dijagnostički kit INGEZIM West Nile Compac proizvođača „Ingenasa“.

4.2.1.1. Principi i postupak izvođenja ELISA INGEZIM West Nile IgM

Princip izvođenja ELISA metode dijagnostičkim kitom INGEZIM West Nile IgM zasnovan je na imunoenzimskom testu. Monoklonska antitela specifična za konjska IgM antitela su fiksirana na polistirensku mikrotitarsku ploču. Uzorci krvnog seruma konja su postavljani na ploču u duplikatu, kao i kontrole i to u dva bazenčića u dve zasebne kolone. Ukoliko u ispitujućem serumu postoje IgM antitela, ona su se vezala za monoklonska antitela na mikrotitarskoj ploči. Inkubirali smo 1 čas na 20-25°C, i onda izvršili ispiranje, kako bi elimisali sav materijal iz krvnog seruma koji se nije vezao za ploču. Po ispiranju dodali smo na ploču u jedan bazenčić (u bazenčiće jedne kolone) antigen virusa Zapadnog Nila, a u drugi bazenčić (u bazenčiće druge kolone) kontrolni negativni antigen i inkubirali 16 do 24 časa na 20-25°C. Ukoliko su u ispitujućem serumu postojala specifična IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila ona su vezala dodati antigen. Posle ispiranja dodali smo se konjugat, koga čine monoklonska antitela specifična za glikoprotein E (domen III) virusa Zapadnog Nila, koja su konjugovana peroksidazom. Posle inkubiranja od 1. časa na 20-25°C i ispiranja dodali smo substrat, što je dovelo do enzimske kolorimetrijske reakcije koju smo merili ELISA čitačem primenom optičkog filtera talasne dužine od 450 nm. Pojava boje znači da su postojala specifična IgM antitela na virus Zapadnog Nila u ispitujućem serumu.

4.2.1.2. Principi, postupak izvođenja ELISA INGEZIM West Nile Compac kao i izračunavanje karakteristika testa

Princip rada INGEZIM West Nile Compac zasnovan je na principu blokirajuće (kompetitivne) imunoenzimske reakcije. Na polistirensku mikrotitarsku ploču nanesen je inaktivisani antigen virusa Zapadnog Nila. Uzorke ispitivanih krvnih seruma, kao i pozitivnih i negativnih kontrola smo dodali u odgovarajuće bunarčiće na mikrotitarskoj ploči, prema prethodno napravljenom rasporedu i inkubirali 16 do 24 časa na 20-25°C. Ukoliko je u ispitujućem serumu bilo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, ona su se vezala za virusni antigen na ploči. Posle ispiranja dodali smo konjugat, a to su specifična monoklonska antitela (konjugovana peroksidazom) protiv glikoproteina E virusa Zapadnog Nila, koje se takmiče sa antitelima iz ispitujućeg seruma. Ako su se u serumu nalazila specifična antitela na virus Zapadnog Nila, ona su se vezala za antigen na ploči i nije došlo do vezivanja dodatih specifičnih monoklonskih antitela iz konjugata koja su ispiranjem eliminisana. Nasuprot tome, ako serum nije sadržao specifična antitela, obeležena monoklonska antitela iz konjugata su se vezala za antigen virusa Zapadnog Nila na ploči. Posle inkubiranja od 1. časa ispran je sadržaj u bunarčićima, i dodat je substrat koji je dao kolorimetrijsku reakciju ukoliko su se obeležena monoklonska antitela (konjugovana enzimom peroksidazom) vezala za antigen na ploči. Ako je u ispitujućem serumu bilo specifičnih antitela na virus Zapadnog Nila, nije bilo prebojavanja reakcije jer su obeležena monoklonska antitela eliminisana ispiranjem. Reakcija je očitavana ELISA čitačem primenom optičkog filtera talasne dužine od 450 nm.

Dobijene vrednosti optičke gustine su preračunavane primenom odgovarajuće formule i u odnosu na postavljene pozitivne i negativne kontrolne uzorke. Na ovaj način dobijene pojedinačne vrednosti za svaki uzorak krvnog seruma klasifikovane su kao

pozitivne ili negativne vrednosti, odnosno kao pozitivni ili negativni nalazi na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila za ispitane uzorke.

Dijagnostička osetljivost ELISA testa iznosila je $Se=100\%$ i specifičnosti $Sp=98.8\%$ (INGEZIM West Nile Compac – Ingenasa, Španija, Uputstvo proizvođača za izvođenje testa). Pozitivna i negativna prediktivna vrednost testa (PPV, NPV) izračunati su uz pomoć reverznog računa i primeni formula za izračunavanje stvarne prevalencije, pojavne prevalencije, ukupnog broja stvarno pozitivnih uzoraka, stvarno negativnih uzoraka, lažno pozitivnih i lažno negativnih uzoraka. Ulaznih parametara za ovaj račun bili su kao su ukupan broj ispitanih uzoraka seruma i broj uzoraka koji su reagovali pozitivno na ELISA testu.

Pojavna prevalencija izračunata je uz pomoć sledeće formule:

$$P = \frac{(AP+Sp-1)}{(Sp+Se-1)} \quad (1)$$

pri čemu je:

- P - stvarna prevalencija infekcije,
- AP- pojavna prevalencija
- Se- dijagnostička osetljivost testa,
- Sp- dijagnostička specifičnost testa

Da bi smo izračunali PPV i NPV, potrebno je najpre reverznim računom izračunati ukupno broj stvarno pozitivni jedinki (TP), lažno pozitivnih (FP), stvarno negativnih (TN) i lažno negativnih slučajeva infekcije (FN). Ovakav proračun je baziran na primeni formula za izračunavanje pojavne prevalencije:

$$AP = \frac{T(+)}{n} \quad (2)$$

pri čemu je T(+) ukupan broj uzoraka koji su reagovali pozitivno na testu, dok je n ukupan broj ispitanih uzoraka ELISA testom.

Ukupan broj stvarno pozitivnih uzoraka (TP) izračunat je uz pomoć sledeće formule:

$$TP=T(+)*Se \quad (3)$$

Ukupan broj stvarno negativnih uzoraka (TN) izračunat je uz pomoć sledeće formule:

$$TN=T(-)*Sp \quad (4)$$

pri čemu je T(-) ukupan broj uzoraka koji su reagovali negativno na testu.

Pozitivnu prediktivnu vrednost testa izračunavamo uz pomoć sledeće formule, a na bazi prethodno izračunatih parametara:

$$PPV = \frac{TP}{(TP+FP)} \quad (5)$$

dok je NPV izračunata na bazi sledeće formule:

$$NPV = \frac{TN}{(TN+FN)} \quad (6).$$

Takođe, za navedene ELISA testove izračunate su i vrednosti osetljivosti i specifičnosti testa na nivou zapata, odnosno farme. Za ovaj proračun upotrebljene su sledeće formule:

$$HSe = 1 - (1 - AP)^n \quad (7)$$

$$HSp = Sp^n \quad (8)$$

Formule od 1-8, upotrebljene u postupku ispitivanja karakteristika ELISA testa preuzete su iz literature Dohoo i sar., 2009.

4.2.2. Real time RT-PCR

Utvrđivanje nukleinske kiseline genoma virusa groznice Zapadnog Nila (WNV) u ispitivanim uzorcima vršeno je kroz više povezanih postupaka koji obuhvataju: 1) izolaciju-ekstrakciju RNK iz uzoraka i 2) real-time RT-PCR (TaqMan reakcija) – multipleks format upotrebom komercijalnog kita "RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System", proizvođača „Invitrogen – Life Technologies“.

4.2.2.1. Principi i postupak izolacije-ekstrakcije RNK

Izolacija RNK se vršila u PCR mikrotubama od 1,5 ml. Tokom postupka homogenizacije ili lize uzorka, TRIzol® Reagent održava integritet RNK u toku razaranja i razgradnje ćelijskih komponenata. Izolovana - ekstrahovana RNK ostaje isključivo u vodenoj fazi uzorka. Nakon odvajanja vodene faze i dodavanja izopropil alkohola, vršena je precipitacija izolovane RNK koja je koncentrisana centrifugiranjem. Izopropil alkohol se odbacivao, a prikupljena RNK na dnu mikrotube je, radi daljeg prečišćavanja, isprana sa 75% ledenim (-20 °C) 96% etanolom. Nakon centrifugiranja i kratkotrajnog sušenja precipitat RNK je resuspendovan dodavanjem vode za PCR. Ekstrahovana i resuspendovana RNK se koristila odmah u real time RT-PCR reakciji ili se čuvala na -70 °C ili ukoliko je materijal obrađivan u kraćem roku na -20°C.

Uzorci krvi sa antikoagulansom, krvnog seruma, plazme i suspenzije i supernatanta kultura ćelija su se direktno koristili za izolaciju RNK. Uzorci tkiva i organa su se obrađivali kao 10% suspenzija u fiziološkom rastvoru (1 g tkiva sitno iseckanog i maceriranog tkiva i 9 mL fiziološkog rastvora). Nakon obrade i centrifugiranja supernatant se koristio za izolaciju RNK. Brisevi (nosni, ždrelni..) su pripremani tako što je deo štapića brisa sa vatom odsecan u mikrotubicu od 1,5 mL, u koju se dodavalo 0,75 mL fiziološkog rastvora nakon čega je sledilo mešanje na vorteksu, a zatim se supernatant koristio kao uzorak u izolaciji (ekstrakciji) RNK.

Za ispitivanje prisustva virusa u komarcima, odvojene jedinke vrste *Culex pipiens* (biotipovi *pipiens* i *modestus*) su pulovane u zbirni uzorak od 30 – 50 jedinki u mikrotube od 2 mL na koje je dodavan 1 mL fiziološkog rastvora, kao i metalna kuglica prečnika 4 mm. Tako pripremljene mikrotube su stavljane u instrument Tissue Lyser (Qiagen) u kojem je vršena destrukcija tkiva komaraca na frekvenciji od 50 herca u trajanju od 5 minuta. Nakon destrukcije, mikrotube su centrifugirane, a superantant je razređen 10 puta i korišćen za izolaciju RNK.

4.2.2.2. Principi i postupak izvođenja *real-time* RT-PCR reakcije

Princip detekcije genoma virusa Zapadnog Nila u uzorku je zasnovan na molekularnoj metodi reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i to *TaqMan* tip reakcije koja se odvija u jednoj istoj tubi i u jednom, neprekinutom ciklusu („*one-tube*“ ili „*one-step real-time* RT-PCR“). Reakcija je izvedena upotrebom komercijalnog kita RNA UltraSense™ One-StepQuantitative RT-PCR System, po uputstvu proizvođača. Metodom „*One-step*“ *real-time* RT-PCR se izolovana RNK putem enzima reverzne transkriptaze prevela u jednolančanu DNK (cDNK) koja se u nastavku reakcije *real-time* PCR pomoću termostabilne DNK polimeraze umnožena do merljive količine. Kompletna reakcija se odvijala u istom, jedinstvenom puferском sistemu i izbalansiranim koncentracijuma MgCl₂ i dezoksi-nukleotidnih baza (dNTP). Princip reakcije je zasnovan na enzimskom umnožavanju specifičnog dela genoma virusa, definisanog primenjenim oligonukleotidnim prajmerima. Vezivanjem i uklapanjem oligonukleotidne *TaqMan* probe na specifičnom delu lanca, došlo je do emisije energije koju je detektovao *real-time* PCR aparat. Ovo je detektorski sistem *TaqMan real-time* RT-PCR reakcije koji je merio intenzitet energije koji se oslobodio tj. broj nosintetisanih specifičnih delova genoma virusa Zapadnog Nila i pokazivao ih je tokom svakog ciklusa u stvarnom vremenu.

Upotrebom odgovarajućeg seta prajmera i probe u uzorku se može utvrditi prisustvo svih genotipova tj. linija („*lineage*“) virusa Zapadnog Nila. Ukoliko je u uzorku bio prisutan genom virusa Zapadnog Nila, tokom reakcije se pojavljivao pozitivan signal energije, koji je svakim narednim ciklusom rastao logaritamski, što se na ekranu pojavljivalo u vidu rastuće krive.

Pripremljeni uzorci su testirani na prisustvo RNK genoma virusa Zapadnog Nila pomoću tzv. jednostepene reakcije reverzne transkripcije – lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR - *real-time one-step* Reverse Transcription – Polimerase Chain Reaction) koja je specifična za detekciju genoma virusa Zapadnog Nila posebno sojeva virusa linije 1 i 2 kao najznačajnijih. Ukratko, RT-qPCR je sproveden korišćenjem komercijalnog kita „RNA UltraSense™ RT-PCR sistem“ (Life Technologies Corporation) sa prajmerima (forvard VNproC-F10: 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3' i reverzni VNproC-R153: 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3') i *TaqMan* probe (VNproC-proba 5'-FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-TAMRA-3 ') koja su specifični za deo gena koji kodira sintezu proteina C nukleokapsida virusa Zapadnog Nila, prema proceduri kako su to opisali Linke i sar., 2007. Svaka reakcija je sadržavala 15 mL reakcione mešavine koja je sadržala 1 µl RNA UltraSense reakcionog pufera, 20 mM svakog prajmera, 10 mM VNproC probe, 1 µl ROX boje i 1 µl RNA UltraSense enzima. Ovoj

reakcionoj mešavini dodato je 5 µl uzorka ekstrakta nukleinske kiseline da bi se dobila konačna zapremina reakcije od 20 µl. Uslovi temperaturne reakcije su bili: 15 minuta na 50 °C, zatim 2 minuta na 95 °C, nakon čega je usledilo 50 ciklusa ponavljanja od 15 sekundi na 95 °C i 50 sekundi na 60 °C.

4.2.3. Statistička obrada podataka

4.2.3.1. Procena rizika

U statističkoj analizi mogućih faktora rizika povezanih sa infekcijom virusom groznice Zapadnog Nila korišćene su deskriptivne statističke metode i testiranje hipoteza kao što su hi-kvadrat test, odnos prevalencija, odnos šansi, Vilksov G kvadrat test i Fišerov test. S obzirom na to da pojava groznice Zapadnog Nila zahteva delovanje više povezanih uzroka kao što su prisustvo virusa i vektora u okruženju, prijemčivog domaćina, pored klasičnog pristupa procene rizika baziranog na frekvencionističkoj deskriptivnoj statistici, u statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćena je i Bajesova statistika (*Bayesian Network Analysis*). Uz pomoć Bajesove mreže urađena je kvantitativna procena rizika i analiza povezanosti pojavljivanja groznice Zapadnog Nila kod različitih vrsta životinja sa pretpostavljenim faktorima rizika. Grafičko prikazivanje promenljivih i sa njima povezanih događaja vršeno je usmerenim acikličnim grafom (DAG- *Directed Acyclic Graph*). Bajesovom mrežom analizirani su slučajevi groznice Zapadnog Nila i mogući faktori rizika kao što su prisustvo komaraca, vrsta životinja i način držanja kao faktori koji doprinose nastanku bolesti.

4.2.3.2. Prostorno-vremenska analiza epizootije Groznice Zapadnog Nila

Pored gore opisanih statističkih testova, kada su analizirani ekološki faktori koji dovode do učestalijeg pojavljivanja infekcije kod pojedinih životinjskih vrsta, posebna pažnja je bila posvećena izučavanju mogućih obrazaca i faktora koji dovode do formiranja međusobno povezanih prostornih i vremenskih klastera. Za analizu grupisanja klastera obolelih ljudi i životinja, korišćene su metode i tehnike geoprostorne analize, kao što su „*hot spot*” analiza (Getis-ord GI* statistika), analiza gustine kernela (Parzenovih prozora), Moranov I test i Kuldorfova prostorna sken statistika (Altman 1991; Forthofer i sar., 2007).

4.2.3.2.1. Analiza gustine klastera

Analiza gustine klastera (*Kernel density analysis*) urađena je uz pomoć programskog paketa ArcGIS desktop 10.5, primenom alata *Spatial Analyst Tool/Kernel Density*. Ovaj alat se koristi za izračunavanje gustine slučajeva infekcije (pozitivni slučajevi u neposrednom okruženju oko svakog pojedinačnog tačkastog objekta na mapi koja predstavlja registrovan slučaj infekcije). Analiza gustine klastera podrazumeva da se iznad svakog tačkastog objekta na mapi prilagođava kriva koja predstavlja distribuciju verovatnoća infekcije virusom groznice Zapadnog Nila. Površina svakog segmenta krive je najveća neposredno iznad tačkastog objekta i opada sa udaljavanjem od objekta. Grafički se na karti prikazuje kao gubljenje intenziteta boje. Kada rastojanje dostigne zadanu vrednost perimetra, vrednost gustine klastera dostiže 0. Gustina svake izlazne rasterske ćelije na mapi izračunava se dodavanjem vrednosti svih površina kernela (jezgra Parzenovih prozora) koji prekrivaju centar rasterske ćelije (ćelije koje čine rastersku sliku) (Silverman i sar., 1986).

4.2.3.2.2. Hot spot analiza klastera

Prostorno vremenska hot spot analiza podrazumeva analiziranje mogućih obrazaca po kojima se formiraju klasteri, odnosno analiziranje grupa (klastera) određene pojave na nekom geografskom području. U ovom istraživanju jedan klaster je predstavljao grupu, odnosno seriju pozitivnih slučajeva infekcije virusom groznice Zapadnog Nila na jednom geografskom području kod različitih životinjskih vrsta i ljudi. Primenjena metodologija se bazira na Getis-ordovoj G_i^* statistici. Getis-ord G_i^* statistika se bazira na izračunavanju z-statistike i p vrednosti. Z statistika određuje da li su ispitivane vrednosti određenog atributa entiteta (elemenata) klastera iznad ili ispod uprosečenih vrednosti na nivou celog geografskog područja (kojim se određuju „tople” ili „hladne” tačke), dok p vrednosti opredeljuju da li je grupisanje jedinica u klaster rezultatom slučajnog događaja ili statistički značajnog delovanja nekog faktora rizika, fenomena ili pojave koja je uslovlila grupisanje. Na mapi su klasteri sa značajnijim brojem seropozitivnih životinja tzv. „tople tačke” (*Hot Spot*) prikazani crvenom bojom, dok su žutom bojom prikazani klasteri koji nisu nastali kao rezultat delovanja zajedničkog faktora rizika, odnosno verovatnoća grupisanja pojedinačnih slučajeva infekcije virusom groznice Zapadnog Nila je rezultat slučajnog događaja na nivou pouzdanosti od 95%.

Z-vrednosti, mogu biti pozitivne i negativne, a u zavisnosti od toga određeni klaster se definiše kao „topli” ili „hladni”. U slučajevima kada imamo statistički značajne pozitivne Z vrednosti govorimo o tzv. „vrućim” tačkama. Što je veća statistička značajnost Z vrednosti, to je veće grupisanje entiteta sa većim brojem inficiranih jedinki: farma, seosko gazdinstvo ili slična jedinica sa značajno većim brojem pozitivnih jedinki u odnosu na određenu grupu sa manjem brojem pozitivnih jedinki. U slučajevima negativne Z vrednosti govorimo o „hladnim” tačkama, statistički značajnim grupama (klasterima) gde su grupisani entiteti sa manjim brojem pozitivnih jedinki u odnosu na prosečne vrednosti, odnosno grupama u kojima postoji delovanje faktora koji smanjuje rizik infekcije.

Za potrebe ove studije, hot spot analiza je urađena uz pomoć programskog paketa ArcGIS desktop 10.5, primenom alata *Map ping Clusters tool/Spatial Statistics Tools*. Ovaj alat primarno koristi Getis-ord G_i^* statistiku za određivanje statistički značajnih klastera, odnosno njihovo prostorno grupisanje. *Hot spot* analiza podrazumeva analizu entiteta i pronalaženje eventualnih sličnosti, odnosno zajedničkih karakteristika sa susednim entitetima.

4.2.3.2.3. Inkrementalna prostorna autokorelacija

Bitan element za izvođenje analize rizika je određivanje radijusa grupisanja, (perimetra) geografskog područja na kome se analizira grupisanje entiteta u klastere i određuje njihova značajnost. Postoji nekoliko načina za izbor pravog opsega ovog perimetra. Međutim, u praksi najčešće ne postoji idealan opseg za širinu područja na kojoj treba analizirati moguće zajedničke obrasce grupisanja entiteta. Izbor pravog opsega zavisi od izabrane tehnike, poznavanja samog problema i logičkog zaključivanja na bazi prethodnih iskustava. Za potrebe ovog istraživanja izabran je tzv. Menhettan metod (*Manhattan distance method*). Proračun je urađen uz pomoć programskog paketa ArcGIS desktop 10.5, primenom alata *Analyzing pattern/Incremental Spatial Autocorrelation*.

Prostorna analiza autokorelacije uključuje određivanje globalne i lokalne autokorelacije. Prva se može koristiti za određivanje relevantnosti atributa na nivou čitavog istraživnog područja, dok se lokalnom autokorelacijom može odrediti gde se takvi entiteti grupišu, i isto tako odrediti obrazac prostorne distribucije i približni raspon prostorne agregacije. Pokazatelj globalne autokorelacije iskazani su uz pomoć Moranovog I indeksa koji se kreće u opsegu od -1 do +1. Vrednost blizu 1 ili -1 označava snažnu pozitivnu ili negativnu prostornu autokorelaciju. Moranov I test se bazira na određivanju Z-vrednosti i p-vrednosti, koji služe za prihvatanje ili odbacivanje radne hipoteze da su slučajevi groznice Zapadnog Nila nasumično raspoređeni u prostoru.

4.2.3.3. Vremenska, prostorna i prostorno-vremenska analiza klastera

Prostornom analizom autokorelacije može se utvrditi prostorna heterogenost epizootije, ali se ne može otkriti specifični opseg agregacije slučajeva obolevanja, kao i njihovog grupisanja u funkciji vremena. Iz tih razloga su za potrebe ovog istraživanja izvedene tri statistike prostornog skeniranja: vremenska analiza, prostorna analiza i analiza prostorno-vremenskih klastera. Sve navedene analize se zasnivaju na diskretnom *Poissonovom* modelu. Analiza je izvedena uz pomoć tzv. Kulldorfove statistike pretraživanja prostora i vremena (Kulldorff i sar., 2005).

Rezultati p-vrednosti statistike skeniranja, prilagođene su za višestruko testiranje hipoteza, a te vrednosti su korišćene u oceni statističke značajnosti odnosno postojanja obrasca grupisanja klastera.

Vremenske, prostorne i prostorno-vremenske statistike skeniranja se obično koriste za otkrivanje i procenu statističke značajnosti vremenskih i/ili geografskih klastera, bez prethodnih pretpostavki o lokaciji, vremenskom periodu ili veličini tih klastera. Statistika skeniranja se uglavnom koristi za prebrojavanje podataka kao što su slučajevi obolevanja, odnosno incidencija bolesti ili za određivanje mortaliteta na jednom području. Smisao njihovog korišćenja je rano otkrivanje klastera obolelih, odnosno otkrivanje epidemija ili epizootija u ranim fazama. Većina alata koji se koriste u ove svrhe, a bazirani su na statistici skeniranja, prilagođeni su i razvijeni za praćenje bolesti i prebrojavanje pojedinačnih slučajeva oboljevanja, umrlih i prevalencije bolesti, za koje *Poissonova* ili *Bernoulijeva* distribucija predstavljaju osnovu modeliranja slučajne prirode ovih događaja što je iskorišćeno i za analizu podataka u ovom istraživanju (Kulldorff i sar., 2009).

Testiranje hipoteze izvršeno je uz pomoć Monte Karlo metode. Za potrebe ovog istraživanja korišćen je *Open source softver SaTScan software v9.6* iz 2018. godine (<http://www.satscan.org>) (Kulldorff i sar., 2005; Kulldorff i sar., 2009).

Za potrebe studije vremenske (temporalne) analize grupisanja klastera, minimalni vremenski prozor klastera bio je ograničen na 1 dan. Izvršeno je 999 permutacija. Statistički su uzeti u obzir klasteri sa p vrednostima ispod 0,05.

Prostorno-vremenska analiza (permutacije vremena i prostora) - prostorno-vremenski permutacijski model zahteva samo podatke o slučajevima infekcije i informacije o prostornoj lokaciji i vremenu kada je svaki slučaj registrovan. Broj posmatranih slučajeva u mogućem klasteru upoređivan je sa onim šta bi se moglo očekivati da su prostorne i vremenske lokacije svih slučajeva međusobno nezavisne, odnosno da ne postoji interakcija prostor-vreme (Kulldorff i sar., 2018).

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. Rezultati ispitivanja uzoraka komaraca na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila

5.1.1. Monitoring 2017. godine

U toku 2017. godine ispitano je ukupno 74 zbirnih uzoraka komaraca poreklom sa 10 lokacija u opštinama Pančevo i Opovo. U opštini Pančevo lokacije za uzorkovanje komaraca su bile na teritoriji sela Starčevo (2 lokacije), grada Pančevo (jedna lokacija), selo Jabuka (dve lokacije) i selo Glogonj (jedna lokacija). U opštini Opovo lokacije za uzorkovanje komaraca su bile na teritoriji sela Sefkerin (dve lokacije) i teritorija naseljenog mesta Opovo (dve lokacije). Sve lokacije na kojima su uzorkovani komarci su ista mesta sa kojih se već nekoliko godina sprovodi monitoring prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca, odnosno 2014. godine, od kada se prikupljaju uzorci ovih insekata. Svi prikupljeni uzorci komaraca su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR na prisustvo virusa Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo nukleinske kiseline genoma virusa kod 7 uzoraka pulova komaraca (7/74; 9,46%) (jedan zbirni pozitivan uzorak Starčevo, jedan zbirni uzorak Pančevo, četiri zbirna uzorka Jabuka, jedan zbirni uzorak Opovo), što je prikazano u tabeli broj 1. Uzorkovanje komaraca vršeno je četiri puta tokom 2017. godine i to u jedanput u junu mesecu, dva puta u julu i jednom u avgustu mesecu. Treba imati u vidu da je leto 2017. godine bilo izuzetno toplo sa visokim temperaturama vazduha koje su trajale duže vreme (39 - 40 °C). U periodu druge polovine jula i avgusta meseca, spoljne temperature su bile niže od navedenih za nekoliko stepeni.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja uzoraka (broj pozitivnih uzoraka (P) / broj ispitanih uzoraka (I)) komaraca na prisustvo virusa Zapadnog Nila primenom metode *real-time* RT-PCR za period 27.06.-14.08.2017. godine u opštinama Južnobanatskog okruga

Redni broj mesta uzorkovanja	Opština	Mesto	Koordinate	Uzorci od 27.6.	Uzorci od 11.7.	Uzorci od 25.7.	Uzorci od 14.8.	Ukupno P/I
1	Pančevo	Starčevo 9	44,811115 20,694420	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7
2	Pančevo	Starčevo 11	44,80476 20,69110	0/2	0/2	0/1	1/2	1/7
3	Pančevo	Pančevo	44,867028 20,653771	0/2	0/2	1/2	0/2	1/8
4	Pančevo	Jabuka 1	44,947683 20,585050	0/2	0/2	0/2	1/2	1/8
5	Pančevo	Jabuka 2	44,944139 20,589358	0/2	0/1	1/2	2/2	3/7
6	Pančevo	Glogonj	44,987543 20,533721	0/2	0/2	0/2	0/2	0/8
7	Opovo	Sefkerin 1	45,000468 20,493750	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7
8	Opovo	Sefkerin 2	45,006750 20,470500	0/2	0/2	0/2	0/2	0/8
9	Opovo	Opovo 1	45,053383 20,417850	0/2	0/2	0/2	1/1	1/7
10	Opovo	Opovo 2	45,006750 20,470517	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7
Ukupno				0/20	0/19	2/19	5/16	7/74

Legenda: mesta uzorkovanja komaraca:

Starčevo 9 – individualno gazdinstvo u Starčevu, Žarka Zrenjanina 50; Starčevo 11 – ergela u Starčevu, Baštenska 119; Pančevo – centar grada kod Bolnice, Miloša Trebinjca 11; Jabuka 1 – lokacija u centru sela, Goce Delčeva 1; Jabuka 2 – ergela u Jabuci, Tamiška 45; Sefkerin 1 – ulaz u selo, Žarka Zrenjanina 1; Sefkerin 2 – lokacija kod reke, Partizanska 5; Sefkerin 1 – ulaz u selo, Žarka Zrenjanina 1; Opovo 1 – lokacija kod mosta na Tamišu; Opovo 2 – ergela u Opovu, Žarka Zrenjanina 3

Iz Tabele 1. može se uočiti da su prvi pozitivni zbirni uzorci komaraca na virus Zapadnog Nila ustanovljeni u poslednja dva uzorkovanja 25.7. i 14.8. 2017. godine. Procentualno učešće broja pozitivnih u odnosu na ukupan broj uzoraka iznosio je 9,46%.

5.1.2. Monitoring 2018. godine

U toku 2018. godine ispitano je ukupno 66 zbirnih uzoraka komaraca poreklom sa 10 lokacija u opštini Pančevo (Starčevo – dve lokacije za uzorkovanje, Pančevo – jedna lokacija, Jabuka – dve lokacije i Glogonj – jedna lokacija) i opštini Opovo (dve lokacije u naseljenom mestu Opovo i Sefkerin – dve lokacije). Kao što je već navedeno, sve lokacije na kojima su uzorkovani komarci su ista mesta sa kojih se već nekoliko godina, kao i prethodne godine prikupljani zbirni uzorci ovih insekata. Zbirni uzorci komaraca su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR na prisustvo virusa Zapadnog Nila.

Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo nukleinske kiseline genoma virusa Zapadnog Nila kod 15 od 66 (24,2%) zbirnih uzoraka komaraca (četiri zbirna uzorka komaraca su bila pozitivna na prisustvo virusa u Starčevu, dva zbirna uzorka u Pančevu, tri zbirna uzorka u Jabuci, dva zbirna uzorka u Sefkerinu i četiri zbirna uzorka komaraca u Opovu) (grafikoni 1 2 i tabela 2). Uzorkovanje komaraca vršeno je četiri puta u toku 2018. godine i to jedanput u junu mesecu, dva puta u julu i jednom u avgustu mesecu. U svakom terminu utvrđeni su pozitivni zbirni uzorci komaraca na nekom od lokaliteta gde je vršeno uzorkovanje. Podaci o datumu uzorkovanja komaraca, mestu uzorkovanja i geografskim koordinatama na kojima je vršeno uzorkovanje komaraca kao i o rezultatima ispitivanja predstavljeni su u tabeli broj 2.

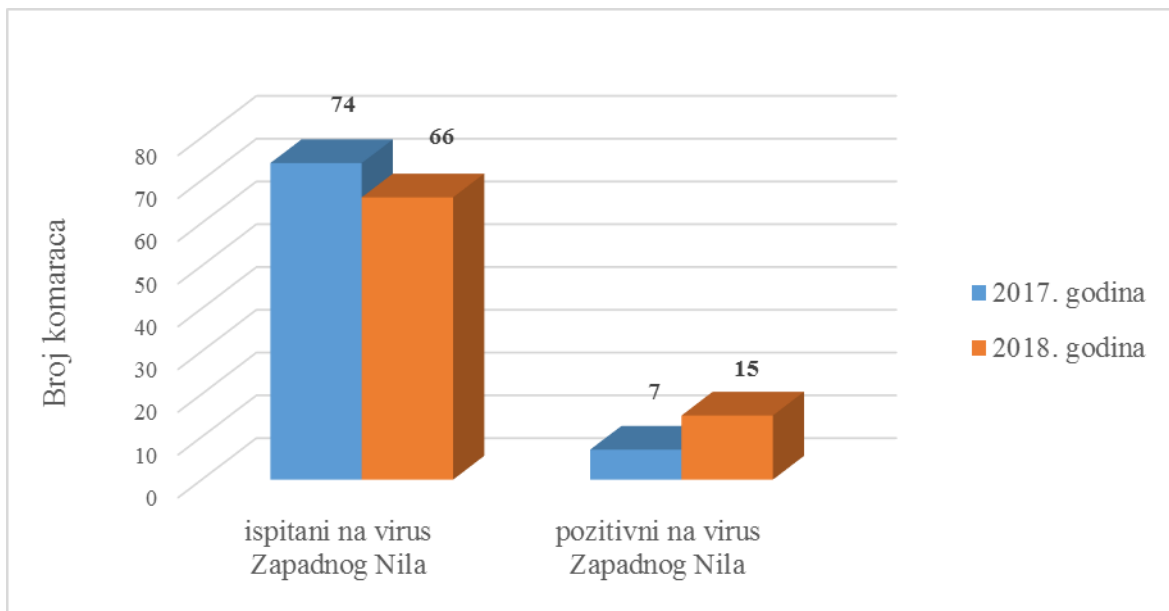
Tabela 2. Rezultati ispitivanja uzoraka (broj pozitivnih uzoraka (P) / broj ispitanih uzoraka (I)) komaraca na prisustvo virusa Zapadnog Nila primenom metode *real-time* RT-PCR za period 18.06.-14.08.2018. godine u opštinama Južnobanatskog okruga

Redni broj mesta uzorkovanja	Opština	Mesto	Koordinate	Uzorci od 19. juna	Uzorci od 10. jula	Uzorci od 24. jula	Uzorci od 14. avgusta	Ukupno P/I
1	Pančevo	Starčevo 9	44,811115 20,694420	1/2	0/2	0/1	1/1	2/6
2	Pančevo	Starčevo 11	44,80476 20,69110	0/2	1/2	1/1	0/1	2/6
3	Pančevo	Pančevo	44,867028 20,653771	0/2	0/2	2/2	0/2	2/8
4	Pančevo	Jabuka 1	44,947683 20,585050	0/2	0/2	1/2	1/2	2/8
5	Pančevo	Jabuka 2	44,944139 20,589358	0/2	1/2	/	0/1	1/5
6	Pančevo	Glogonj	44,987543 20,533721	0/1	0/2	0/2	0/2	0/7
7	Opovo	Sefkerin 1	45,000468 20,493750	0/2	0/2	1/2	0/1	1/7
8	Opovo	Sefkerin 2	45,006750 20,470500	0/2	0/1	0/2	1/2	1/7
9	Opovo	Opovo 1	45,053383 20,417850	0/2	0/1	1/1	0/1	1/5
10	Opovo	Opovo 2	45,006750 20,470517	1/2	1/2	1/2	0/1	3/7
Ukupno				2/19	3/18	7/15	3/14	15/66

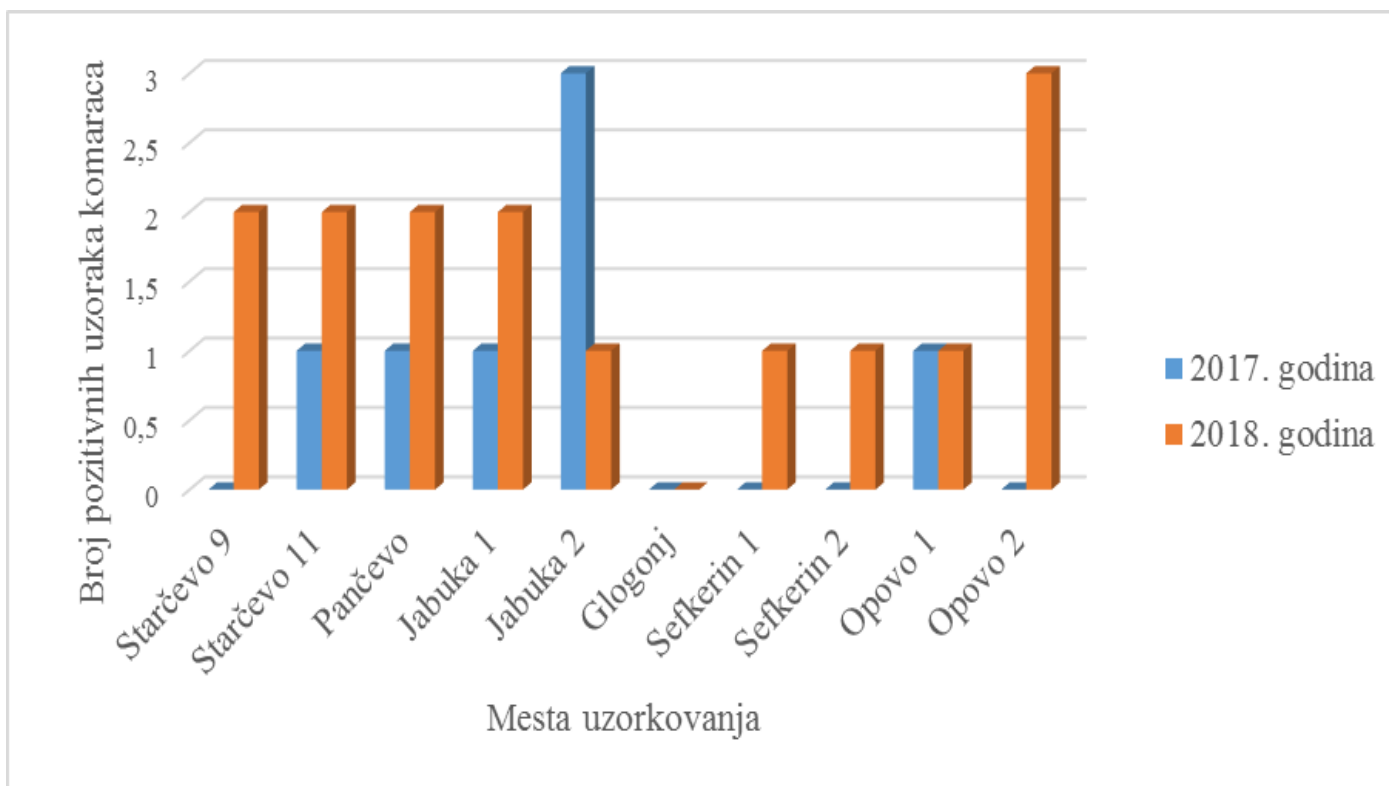
Legenda je
broj 1; / = nije bilo uzorka

ista kao i za Tabelu

Broj pozitivnih zbirnih uzoraka komaraca na virus Zapadnog Nila u 2018. godini bio više nego duplo veći u odnosu na prethodnu godinu (9,5 i 22,7%), iako je ukupan broj ispitanih zbirnih uzoraka komaraca bio manji za više od 16% (Grafikon 1).



Grafikon 1. Broj ispitanih i pozitivnih komaraca na prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2017. i 2018. godini u Južnobanatskom okrugu



Grafikon 2. Broj pozitivnih uzoraka komaraca na prisustvo virusa Zapadnog Nila po mestu uzorkovanja u 2017. i 2018. godini u Južnobanatskog okrugu

Na Grafikonu 2 može se zapaziti da samo na jednom mestu uzorkovanja komaraca (Glogonj) nije potvrđeno prisustvo virusa u komarcima. U nekim mestima uzorkovanja, prisustvo virusa je dokazano više puta u toku sezone praćenja, posebno u toku 2018. godine što govori o konstantom prisustvu virusa u biološkim vektorima a samim tim i većem riziku od obolevanja od groznice Zapadnog Nila u toku 2018. godine.

5.1.3. Rezultati statističke ocene značajnosti razlika u broju registrovanih slučajeva prisustva groznice Zapadnog Nila u ispitivanim grupnim uzorcima komaraca tokom 2017. i 2018. godine u Južnobanatskom okrugu

U Tabeli 3 dat je uporedni prikaz broja ispitanih uzoraka komaraca na prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2017. i 2018. godini u formi tabele kontigencije. Uz to, dat je sumirani i uporedni prikaz dobijenih rezultata laboratorijskih ispitivanja prisustva virusa kod ispitivanih komaraca u 2017. i 2018. godini. Rezultati su sumirani po godinama ispitivanja i analizirani statističkim testovima za ocenu nezavisnosti, odnosno povezanosti između godine ispitivanja i broja registrovanih slučajeva prisustva virusa u uzorcima komaraca.

U Tabeli 4 prikazani su rezultati ocene statističke značajnosti povezanosti između godine ispitivanja i prisustva virusa Zapadnog Nila u uzorcima komaraca. Ocena je urađena hi-kvadrat testom i Vilkovim G^2 testom (testovi nezavisnosti između redova i kolona tabele kontigencije). Hi-kvadrat test iznosio je 4,64 dok je Vilkov G^2 statistik iznosio 4,67. Jačina povezanosti izmerena je izračunavanjem Pirsonovog koeficijenta kontigencije i ϕ_c koeficijenta ($C=0,18$; $\phi_c = 0,18$). Analiza statističkih značajnosti razlika urađena je za 2017. i 2018. godinu.

Tabela 3. Tabela kontigencije pozitivnih i negativnih uzoraka komaraca ispitanih na prisustvo virusa Zapadnog Nila ispitanih tokom monitoringa u 2017. i 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Kalendarska godina	(+)	(-)	UKUPNO
2017.	7 (9,5%)	67 (90,5%)	74 (100%)
2018.	15 (22,7%)	51 (77,3%)	66 (100%)
UKUPNO	22 (15,7%)	118 (84,3%)	140 (100%)

Legenda:

(+)-broj pozitivnih komaraca na virus Zapadnog Nila

(-)-broj negativnih komaraca na virus Zapadnog Nila

Tabela 4. Rezultati ocene međusobne povezanosti između godine ispitivanja i prisustva virusa Zapadnog Nila u uzorcima komaraca

χ^2 – test:	
χ^2	4,6366
χ^2 – kritična vrednost	3,8415
DF- stepeni slobode	1
p-vrednost	0,0313
alfa (greška prvog reda)	0,05
Vilkov G^2 test (Wilks test):	
Vilkov G^2 (Wilks test)	4,6957
Vilkov G^2 - kritična vrednost	3,845
DF – stepeni slobode	1
p-vrednost	0,0302
alfa (greška prvog reda)	0,05
Pirsonov koeficijent kontigencije:	0,18
ϕ_c koeficijent:	0,18
Odnos šansi (odds ratio):	
OR	2,8150
95% CI	1,0690 – 7,4134
z statistika	2,095
p-vrednost	0,0362

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4 odbačena je nulta hipoteza da ne postoji veza između godine ispitivanja i broja registrovanih slučajeva prisustva virusa Zapadnog Nila u uzorcima komaraca, odnosno prihvaćena je alternativna hipoteza da je razlika u broju registrovanih uzoraka komaraca pozitivnih na prisustvo virusa u 2017. i 2018. godini značajna i da nije rezultat statističke greške. Test odnosa šansi pokazuje da je šansa otkrivanja pozitivnih uzorka u 2018. godini bila 2,8150 puta veća u odnosu na 2017. godinu i ograničena intervalom poverenja od 1,0690 do 7,4134 pri zadatom nivo značajnosti od 95%.

5.2. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila

5.2.1. Monitoring u 2017. godini

U toku 2017. godine ispitano je ukupno 158 uzoraka krvnog seruma konja poreklom iz opština Alibunar, Kovačica, Kovin, Opovo, Pančevo i Vršac. Iz opštine Alibunar prikupljeno je 20 uzoraka seruma konja, opštine Kovačica 24, opštine Kovin 21, opštine Opovo 1, opštine Pančevo 59 i opštine Vršac 33 uzoraka seruma. Uzorci krvnih seruma konja su prikupljeni i ispitivani četiri puta u toku 2017. godine i to u mesecu junu, julu, avgustu i septembru. Svi prikupljeni uzorci su ispitani metodom

ELISA na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Rezultati ispitivanja su pokazali da je jedan uzorak konja poreklom iz opštine Vršac bio pozitivan na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ovaj uzorak seruma je bio uzet i ispitan u septembru mesecu 2017. godine. Precizni podaci o datumu uzorkovanja i o poreklu životinja, kao i o rezultatima ispitivanja predstavljeni su u Tabeli broj 5 i Grafikonu 3.

Tabela 5. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisutvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom monitoringa u 2017. godini na teritoriji Južnobanatskog okruga

Serološka ispitivanja konja 2017. god.		Uzorkovanje jun	Uzorkovanje jul	Uzorkovanje avgust	Uzorkovanje septembar
Opština	Mesto / lokalitet uzorkovanja	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano
Alibunar	Ilandža 1	0/3	0/3	0/3	0/3
Alibunar	Ilandža 2	0/2	0/2	0/2	0/2
Kovačica	Samoš 1	0/3	0/6	0/4	0/6
Kovačica	Samoš 2	0/3	/	/	/
Kovačica	Samoš 3	/	/	0/2	/
Kovin	Bavanište 1	0/2	/	/	/
Kovin	Bavanište 2	0/1	/	/	/
Kovin	Bavanište 3	/	0/2	0/2	0/4
Kovin	Kovin 1	0/1	0/1	0/1	0/1
Kovin	Kovin 2	0/1	0/1	0/1	0/1
Kovin	Mramorak	/	/	0/2	/
Opovo	Baranda	0/1	/	/	/
Pančevo	Jabuka	0/2	/	0/5	0/4
Pančevo	Pančevo 1	0/3	0/3	0/3	0/3
Pančevo	Pančevo 2	0/3	0/3	0/3	0/3
Pančevo	Starčevo 11	0/2	0/2	0/2	0/2
Pančevo	Starčevo 4	0/1	0/1	0/1	0/1

Tabela 5. (nastavak) Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisutvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom monitoringa u 2017. godini na teritoriji Južnobanatskog okruga

Serološka ispitivanja konja 2017. god.		Uzorkovanje jun	Uzorkovanje jul	Uzorkovanje avgust	Uzorkovanje septembar
Opština	Mesto / lokalitet uzorkovanja	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano
Pančevo	Starčevo 12	0/3	0/3	0/3	0/3
Vršac	Pavliš 2	/	0/1	/	/
Vršac	Pavliš 3	/	0/1	/	/
Vršac	Pavliš 4	/	0/1	/	/
Vršac	Vršac 1	/	0/7	0/7	1/7
Vršac	Vršac 2	/	0/1	/	/
UKUPNO po mesecima		0/39	0/38	0/41	1/40
UKUPNO ISPITANO 2017.g.			1/158		

/ = nije uzorkovano / ispitivano

Iz Tabele 5 može se videti da je samo kod jedne životinje utvrđeno prisustvo imunoglobulina klase M protiv virusa Zapadnog Nila što je u odnosu na ukupan broj ispitanih seruma 0,63%.

5.2.2. Monitoring u 2018. godini

U toku 2018. godine ispitan je 161 uzorak krvnog seruma konja poreklom iz opština Alibunar, Kovačica, Kovin, Opovo, Pančevo i Vršac. Iz opštine Alibunar prikupljeno je 20 uzoraka seruma konja, opštine Kovačica 20, opštine Kovin 32, opštine Opovo 7, opštine Pančevo 49 i opštine Vršac 33 uzoraka seruma. Uzorci krvnih seruma konja su prikupljeni i ispitivani četiri puta u toku 2018. godine i to u mesecu junu, julu, avgustu i septembru. Svi prikupljeni uzorci su ispitani metodom ELISA na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Rezultati ispitivanja su pokazali da je jedan uzorak konja poreklom iz opštine Kovačica bio pozitivan na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ovaj uzorak seruma je uzet i ispitan u julu mesecu 2018. godine. Precizni podaci o datumu uzorkovanja i o poreklu životinja, kao i o rezultatima ispitivanja predstavljeni su u Tabeli broj 6 i Grafikonu 3.

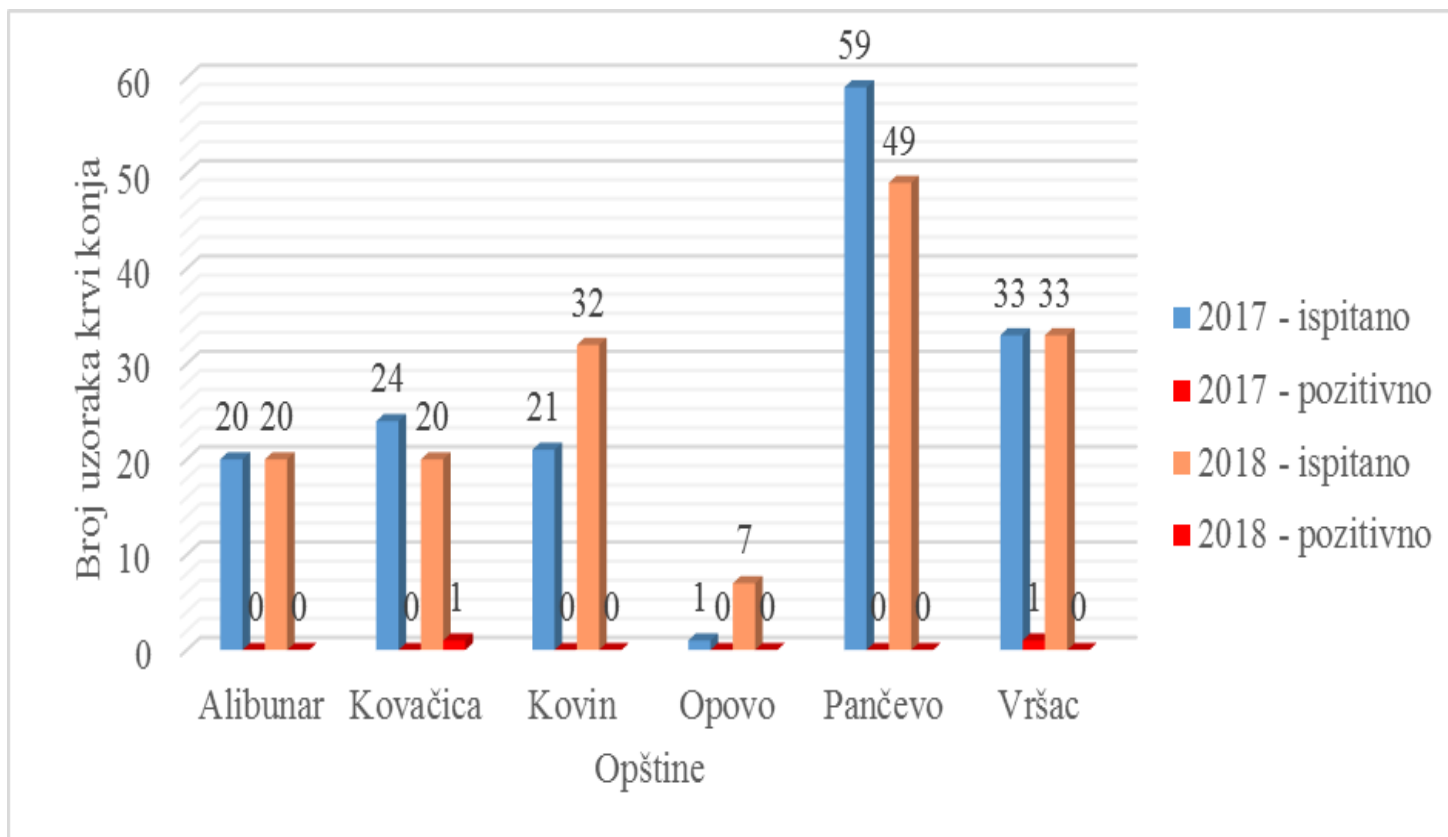
Tabela 6. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisutvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom monitoringa u 2018. godini na teritoriji Južnobanatskog okruga

Serološka ispitivanja konja 2018.		Uzorkovanje jun	Uzorkovanje jul	Uzorkovanje avgust	Uzorkovanje septembar
Opština	Mesto / lokalitet uzorkovanja	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	Opština
Alibunar	Ilandža 1	0/3	0/3	0/3	0/3
Alibunar	Ilandža 2	0/2	0/2	0/2	0/2
Kovačica	Samoš 1	0/5	1/5	0/3	/
Kovačica	Idvor 1	/	/	0/2	0/2
Kovačica	Idvor 2	/	/	/	0/2
Kovačica	Idvor 3	/	/	/	0/1
Kovin	Bavanište 1	0/2	0/2	0/2	0/2
Kovin	Bavanište 4	0/1	0/1	0/1	0/1
Kovin	Bavanište 5	0/2	0/2	0/2	0/2
Kovin	Kovin 1	0/1	0/1	0/1	0/1
Kovin	Kovin 2	0/1	0/1	0/1	0/1
Kovin	Kovin 3	0/1	0/1	0/1	0/1
Opovo	Sakule	0/4	0/1	0/1	0/1
Pančevo	Banatski Brestovac	/	/	0/1	0/1
Pančevo	Jabuka	0/5	0/8	0/5	0/5
Pančevo	Omoljica	0/1	/	/	/
Pančevo	Pančevo 1	/	/	0/3	0/3
Pančevo	Starčevo 11	0/2	0/3	0/3	/

Tabela 6. (nastavak) Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma konja na prisutvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom monitoringa u 2018. godini na teritoriji Južnobanatskog okruga

Serološka ispitivanja konja 2018.		Uzorkovanje jun	Uzorkovanje jul	Uzorkovanje avgust	Uzorkovanje septembar
Opština	Mesto / lokalitet uzorkovanja	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano	pozitivno / ispitano
Pančevo	Starčevo 13	0/1	/	/	/
Pančevo	Starčevo 13	0/1	/	/	/
Pančevo	Starčevo 3	/	0/1	0/1	0/1
Pančevo	Starčevo 14	/	/	/	0/3
Vršac	Vršac 1	0/9	0/8	0/8	0/8
UKUPNO po mesecima		0/41	1/40	0/40	0/40
UKUPNO ISPITANO 2018.g.				1/161	

/ = nije uzorkovano / ispitivano



Grafikon 3. Prikaz rezultata ispitivanja krvi konja na prisustvo IgM antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2017. i 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Na Grafikonu 3 uporedno je prikazan broj uzorkovanih i ispitivanih konja u 2017. i 2018. godini. Zapaža se da je broj uzorkovanih krvi konja po pojedinačnim opštinama skoro konstantan, a po jedan konj je bio serološki pozitivan u 2017. i 2018. godini što ukazuje da je samo kod te dve životinje utvrđena nedavna infekcija virusom groznice Zapadnog Nila.

5.3. Rezultati ispitivanja uzoraka tkiva i briseva poreklom od divljih ptica na prisustvo delova genoma virusa Zapadnog Nila

5.3.1. Monitoring 2017. godine

U toku 2017. godine izvršeno je ispitivanje uzoraka od 22 uginule divlje ptice (unutrašnji organi i mozak divljih ptica). Ispitane divlje ptice su bile poreklom iz opština Pančevo – ukupno 6 uginulih ptica, Alibunar – ukupno 8 uginulih ptica, Bela Crkva – ukupno 7 uginulih ptica i Kovačica jedna uginula ptica. Ispitani materijal je poreklom od 16 vrana (*Corvus corone*), tri svrake (*Pica pica*), jednog sokola vetruške (*Falco tinnunculus*), jednog vodomara (*Alcedo atthis*) i jedne prepelice (*Coturnix coturnix*). Uzorci poreklom od ptica su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR na prisustvo nukleinske kiseline genoma virusa Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo virusa. Precizni podaci o datumu uzorkovanja, vrsti divlje ptice, poreklu životinje kao i o rezultatima ispitivanja predstavljeni su u Tabeli broj 7 i Grafikonu 4.

Tabela 7. Rezultati ispitivanja uzoraka tkiva i briseva poreklom od divljih ptica na prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2017. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum uzorkovanja	Opština	Mesto uzorkovanja	Vrsta uzorka	Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila
21.06.2017.	Pančevo	Pančevo	vodomar	negativno
07.07.2017.	Pančevo	Banatsko Novo Selo	soko vetruška	negativno
07.07.2017.	Alibunar	Vladimirovac	vrana	negativno
31.08.2017.	Pančevo	Pančevo	vrana	negativno
25.09.2017.	Pančevo	Stari Tamiš	vrana	negativno
25.09.2017.	Pančevo	Stari Tamiš	vrana	negativno
03.10.2017.	Pančevo	Stari Tamiš	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	vrana	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	svraka	negativno
03.10.2017.	Bela Crkva	Kaluđerovo	svraka	negativno
10.10.2017.	Alibunar	Dobrica	vrana	negativno
10.10.2017.	Alibunar	Dobrica	vrana	negativno
10.10.2017.	Alibunar	Dobrica	svraka	negativno
19.10.2017.	Alibunar	Alibunar	vrana	negativno
19.10.2017.	Alibunar	Alibunar	vrana	negativno
19.10.2017.	Alibunar	Alibunar	vrana	negativno
19.10.2017.	Alibunar	Alibunar	vrana	negativno
12.12.2017.	Kovačica	Idvor	prepelica	negativno
Ukupno 22 uzorka				negativno

5.3.2. Monitoring 2018. godina

U toku 2018. godine izvršeno je ispitivanje uzoraka poreklom od 54 uginulih divljih ptica (unutrašnji organi (slezina, pluća, bubrezi), mozgovi, brisevi grla – 42 uzoraka organa i mozgova i 12 uzoraka briseva grla). Ptice su bile poreklom iz opština Višac – ukupno 38 ptica, Alibunar – ukupno 4 ptice, Kovačica – 1 ptica, Pančevo – ukupno 7 ptica, Kovin – 2 ptice, Plandište – 1 ptica i Opovo – 1 ptica. Navedeni uzorci su bili poreklom od 7 vrana (*Corvus corone*), 1 svrake (*Pica pica*), 2 sokola vetruške (*Falco tinnunculus*), 5 orla mišara (*Buteo buteo*), 4 čvorka (*Sturnus vulgaris*), 10 golubova (*Columba livia*), 3 gačca (*Corvus frugilegus*), 5 sova ušara (*Bubo bubo*), 2 rečna galeba (*Larus ridibundus*), 1 papagaja (*Melopsittacus undulatus*), 1 čuka (*Otus scops*), 1 male ušare (*Asio otus*), 2 kukuvije (*Tyto alba*), 1 vrapca (*Passer domesticus*), 1 čaplje (*Ardea cinerea*), 2 šumske sove (*Strix aluco*), 2 gugutke (*Streptopelia*

decaorto), 1 šljuke (*Scolopax rusticola*), 1 gavrana (*Corvus corax*), 1 guske (*Anser anser domestica*) i 1 patke (*Anas domestica*). Uzorci poreklom od ptica su ispitani primenom *real-time* RT-PCR metode na prisustvo nukleinske kiseline genoma virusa Zapadnog Nila. Rezultati ispitivanja su pokazali da je u uzorcima poreklom od jedne uginule ptice (uzorci vrane) poreklom sa teritorije opštine Vršac utvrđeno prisustvo virusa. Podaci o datumu uzorkovanja i vrsti divlje ptice, mestu na kome su nađeni leševi uginulih ptica, kao i o rezultatima ispitivanja predstavljeni su u Tabeli broj 8 i Grafikonu 4.

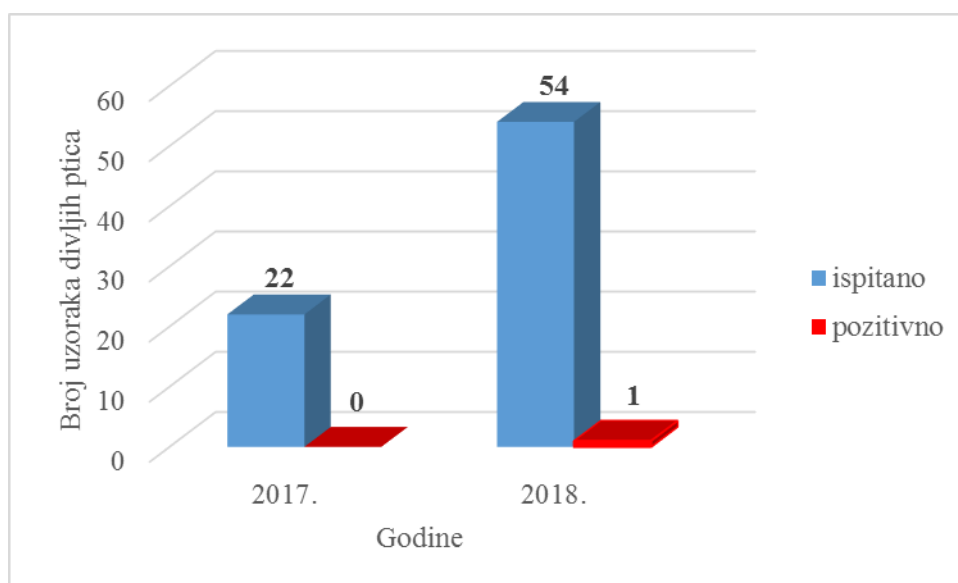
Tabela 8. Rezultati ispitivanja uzoraka tkiva i briseva poreklom od divljih ptica na prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum uzork.	Opština	Mesto uzorkov.	Vrsta ptice	Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila	Datum uzork.	Opština	Mesto uzorkov.	Vrsta ptice	Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila
4.6.2018.	Alibunar	Lokve	crna vrana	negativno	9.10.2018.	Pančevo	Pančevo	čvorak	negativno
6.6.2018.	Kovačica	Kovačica	orao mišar	negativno	16.10.2018.	Vršac	Vršac	šumska sova*	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	crna vrana	negativno	19.10.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	svraka	negativno	19.10.2018.	Vršac	Vršac	gugutka	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	soko vetruška	negativno	22.10.2018.	Pančevo	Pančevo	papagaj	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	crna vrana	negativno	23.10.2018.	Vršac	Vršac	šljuka*	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	siva vrana	negativno	26.10.2018.	Vršac	Vršac	čvorak	negativno
5.7.2018.	Vršac	Vršac	siva vrana	pozitivno	26.10.2018.	Vršac	Vršac	čvorak	negativno
10.7.2018.	Pančevo	Starčevo	golub	negativno	26.10.2018.	Vršac	Vršac	čvorak	negativno
2.8.2018.	Kovin	Kovin	bris ćuk	negativno	30.10.2018.	Pančevo	Pančevo	gavran	negativno
28.8.2018.	Kovin	Kovin	mala ušara	negativno	30.10.2018.	Vršac	Vršac	šumska sova	negativno
5.9.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno	08.11.2018.	Pančevo	Pančevo	crna vrana	negativno
5.9.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno	26.11.2018.	Vršac	Vršac	orao mišar*	negativno

Tabela 8. (nastavak) Rezultati ispitivanja uzoraka tkiva i briseva poreklom od divljih ptica na prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnibanatskom okrugu

Datum uzork.	Opština	Mesto uzorkov.	Vrsta ptice	Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila	Datum uzork.	Opština	Mesto uzorkov.	Vrsta ptice	Prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila
12.9.2018.	Vršac	Vršac	orao mišar*	negativno	26.11.2018.	Vršac	Vršac	gugutka*	negativno
12.9.2018.	Vršac	Vršac	orao mišar*	negativno	26.11.2018.	Vršac	Vršac	rečni galeb*	negativno
12.9.2018.	Vršac	Vršac	soko vetruška*	negativno	3.12.2018.	Vršac	Vršac	sova ušara	negativno
12.9.2018.	Vršac	Vršac	sova kukuvija*	negativno	3.12.2018.	Vršac	Vršac	sova ušara	negativno
12.9.2018.	Vršac	Vršac	gačac*	negativno	3.12.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno
19.9.2018.	Vršac	Vršac	sova ušara*	negativno	12.12.2018.	Vršac	Vršac	gačac*	negativno
19.9.2018.	Vršac	Vršac	sova ušara*	negativno	12.12.2018.	Vršac	Vršac	kukuvija*	negativno
1.10.2018.	Plandište	Kupinik	vrabac	negativno	12.12.2018.	Vršac	Vršac	orao mišar*	negativno
3.10.2018.	Opovo	Sakule	čaplja	negativno	19.12.2018.	Alibunar	Nikolinci	crna vrana	negativno
5.10.2018.	Vršac	Vršac	gačac	negativno	19.12.2018.	Alibunar	Seleuš	guska	negativno
5.10.2018.	Vršac	Vršac	sova ušara	negativno	19.12.2018.	Alibunar	Seleuš	patka	negativno
5.10.2018.	Vršac	Vršac	rečni galeb	negativno	21.12.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno
8.10.2018.	Pančevo	Starčevo	golub	negativno	21.12.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno
8.10.2018.	Pančevo	Starčevo	golub	negativno	21.12.2018.	Vršac	Vršac	golub	negativno
Ukupno			54 uzoraka/ 1 pozitivan						

Legenda: * Brisevi grla – ždrelni brisevi živih ptica



Grafikon 4. Usporedni prikaz rezultata ispitivanja prisustva genoma virusa Zapadnog Nila sprovedenih kod divljih ptica tokom 2017. i 2018. godine u Južnobanatskom okrugu

Na Grafikonu 4 može se uočiti broj ispitanih uzoraka poreklom od divljih ptica i rezultat ispitivanja prisustva virusa metodom *real time* RT-PCR testa. U 2018. godini pregledan je veći broj uzoraka nego u 2017. godini, a u organima jedne sive vrane (1,85%) od ukupno 54 pregledana uzorka utvrđeno je prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila.

5.4. Ispitivanje prisustva infekcije/serokonverzije izazvane virusom Zapadnog Nila kod domaćih životinja

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja, odnosno mogućnosti da se kod ispitivanih životinjskih vrsta detektuje serološki odgovor na infekciju virusom Zapadnog Nila, a sve u cilju određivanja seroprevalencije i identifikacije potencijalnih sentinel vrsta koje bi poslužile, odnosno mogle da budu uključene u programe praćenja pojave i intenziteta cirkulacije virusa Zapadnog Nila u prirodi. Ispitivanjima su obuhvaćena goveda gajena u intenzivnim uslovim proizvodnje, odnosno odrasla goveda i podmladak na registrovanim farmama, zatim svinje gajene na intenzivan i ekstenzivan način kao i živina uzgajana na farmama i seoskim gazdinstvima Južnobanatskog okruga.

5.4.1. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma goveda

U cilju utvrđivanja novih potencijalnih sentinel vrsta životinja u nadzoru groznice Zapadnog Nila odabrana su goveda iz više razloga. Na prvom mestu ova životinjska vrsta se gaji praktično u svakom naseljenom mestu, pa je samim tim prisutna u mestima gde je dokazana cirkulacija virusa Zapadnog Nila. Goveda su grla koja se koriste radi

proizvodnje mleka i mesa, drže se u relativno većem broju, i nema barijera za višekratno uzorkovanje ukoliko ima potreba za tim. Ekonomska vrednost goveda je mnogo niža od sportskih konja, goveda retko menjaju lokacije na kojima se drže pa su dobri pokazatelji cirkulacije patogena na nekom lokalitetu.

Krave kao starije jedinke koje su veći broj godina locirane na jednom području, i koje su bile prisutne u više sezona aktivnosti vektora i cirkulacija virusa Zapadnog Nila u području u kojem postoji jasno utvrđena cirkulacija virusa Zapadnog Nila duži niz godine su ispitivane iz razloga da se utvrdi:

1. da li goveda mogu biti inficirana virusom Zapadnog Nila i da na tu infekciju mogu serološki odgovoriti prisustvom merljivih specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila;
2. u kojem procentu goveda (koja su višegodišnje izložena cirkulaciji virusa) mogu biti seropozitivna;
3. da li se mlade jedinke koje su rođene od kraja oktobra tj od novembra prethodne godine, mogu koristiti kao sentinel vrste za detekciju cirkulacije virusa Zapadnog Nila u aktuelnoj sezoni (u ovom slučaju 2018. godini) i u kojem procentu bi ona mogla biti inficirana odnosno prezentovala serološki odgovor na infekciju virusom Zapadnog Nila u vidu merljivih antitela i time mogla koristiti kao dovoljno osetljiva sentinel vrsta za program praćenja virusa Zapadnog Nila.
4. da li postoji pasivni prenos antitela sa majki na telad i ako postoji koliko dugo takva antitela perzistiraju, da bi se izbeglo da se kod mladih životinja koje bi se možda koristile kao sentinal za program praćenja, detektuju lažno pozitivne jedinke (odnosno jedinke sa maternalnim imunitetom).

5.4.1.1. Uzorci krvnih seruma teladi, junica i krava – Farma “Vojvodina” u Starčevu, opština Pančevo

U cilju realizacije predviđenih ispitivanja utrdivanja pojave i postojanja merljivog serološkog odgovora kod goveda na virus Zapadnog Nila u području u kojem se ovaj virus pojavljuje i intenzivno cirkuliše više godina unazad na farmi „Vojvodina“ u Starčevu izvršeno je prikupljanje 10 uzoraka krvnog seruma krava, 10 uzoraka krvnog seruma junica starosti od 10 meseci, 10 uzoraka krvnog seruma junica starosti od 8 meseci kao i 20 uzoraka krvnog seruma teladi (izvršeno je dvokratno uzimanje uzoraka krvi teladi u vremenskom intervalu od 60 dana). Precizni podaci o datumu uzorkovanja, identifikacionim brojevima ušnih markica, starosti životinja, podaci koji povezuju krave sa teladima kao i sami rezultati ispitivanja, prikazani su u tabeli broj 9.

Prikupljeni uzorci krvnog seruma krava, junica i teladi su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA (Tabele 9, 10 i 11 i Grafikon 6). Rezultati ispitivanja su potvrdili da je u jednom uzorku krvnog seruma teleta iz prvog uzorkovanja (29.03.2019. godine) utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, dok su ostala telad bila seronegativna. Treba naglasiti da je seropozitivno tele (starost 79 dana) bilo poreklom od seropozitivne

majke. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma teladi prikupljenih tokom drugog uzorkovanja (3.06.2019.godine) su potvrdili da su sva telad bila seronegativna.

Ispitivanjem 10 uzoraka krvnog seruma krava (jednokratno prikupljanje uzoraka 24.09.2018. godine) sa farme „Vojvodina“ u Starčevu utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod devet uzoraka krvnog seruma dok je jedan uzorak krvnog seruma krava bio seronegativan. Starosna struktura uzorkovanih krava kretala se od 2. do 7 godina starosti.

Rezultati prikazani u tabeli 10 pokazuju da je od 10 krava samo jedna bila serološki negativna, dok je 90% testiranih životinja imalo specifična antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Uz to treba naglasiti da za razliku od ELISA testa korišćenog za otkrivanje specifičnih antitela kod konja, koji je specifično dizajniran za detekciju imunoglobulina klase IgM, kompetitivni ELISA test, otkriva imunoglobuline klase IgG.

Tabela 9. Rezultati ispitivanja teladi sa farme „Vojvodina“ Starčevo, na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom dva uzorkovanja u 2019. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Starost u mesecima	Uzorkovanje	Rezultat serološkog pregleda	Br. ušne markice majke	Serološki status majke
1	29.3.2019	7177156827	3 meseca	Prvo uzorkovanje	negativno	7115540472	pozitivno
2	29.3.2019	7117156830	3 meseca		negativno	7104197392	pozitivno
3	29.3.2019	7197156831	3 meseca		negativno	7185540440	negativno
4	29.3.2019	7157156833	2,5 meseca		negativno	7164027387	pozitivno
5	29.3.2019	7137156834	2,5 meseca		pozitivno	7175211213	pozitivno
6	29.3.2019	7107156835	2,5 meseca		negativno	7184286153	pozitivno
7	29.3.2019	7127156839	2,5 meseca		negativno	7106467881	pozitivno
8	29.3.2019	7187156841	2,5 meseca		negativno	7194509898	pozitivno
9	29.3.2019	7147156843	2 meseca		negativno	7136668562	pozitivno
10	29.3.2019	7197156845	2 meseca		negativno	7116643148	pozitivno
11	3.6.2019	7177156827	5 meseci	Drugo uzorkovanje	negativno	7115540472	pozitivno
12	3.6.2019	7117156830	5 meseci		negativno	7104197392	pozitivno
13	3.6.2019	7197156831	5 meseci		negativno	7185540440	negativno
14	3.6.2019	7157156833	5 meseci		negativno	7164027387	pozitivno
15	3.6.2019	7137156834	4,5 meseca		negativno	7175211213	pozitivno
16	3.6.2019	7107156835	4,5 meseca		negativno	7184286153	pozitivno
17	3.6.2019	7127156839	4,5 meseca		negativno	7106467881	pozitivno
18	3.6.2019	7187156841	4,5 meseca		negativno	7194509898	pozitivno
19	3.6.2019	7147156843	4,5 meseca		negativno	7136668562	pozitivno
20	3.6.2019	7197156845	4,5 meseca		negativno	7116643148	pozitivno

Legenda: geografske koordinate farme Vojvodina Starčevo N 44,803753 E 20,725773

Tabela 10. Rezultati serološkog ispitivanja krava sa farme „Vojvodina“ Starčevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost krava	Rezultat serološkog pregleda
1	24.9.2018	7115540472	24.04.2014	53 meseca	pozitivno
2	24.9.2018	7104197392	16.10.2011	83 meseca	pozitivno
3	24.9.2018	7185540440	24.03.2014	54 meseca	negativno
4	24.9.2018	7164027387	25.09.2011	84 meseca	pozitivno
5	24.9.2018	7175211213	18.04.2013	65 meseci	pozitivno
6	24.9.2018	7184286153	22.11.2011	82 meseca	pozitivno
7	24.9.2018	7194509898	15.03.2013	66 meseci	pozitivno
8	24.9.2018	7116643148	01.08.2016	25 meseci	pozitivno
9	24.9.2018	7106467881	18.07.2015	38 meseci	pozitivno
10	24.9.2018	7136668562	19.08.2016	25 meseci	pozitivno

Legenda: geografske koordinate farme Vojvodina Starčevo N 44,803753 E 20,725773

U uzorcima krvnog seruma junica starosti od 8 meseci utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela kod 7 od 10 ispitanih uzoraka seruma. U uzorcima krvnog seruma junica starosti od 10 meseci, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je ustanovljeno kod 4 uzorka seruma, dok je preostalih 6 uzoraka bilo negativno. Rezultati ovih ispitivanja koja su nastala kao odgovor na infekciju mladih jedinki, rođenih nakon sezone cirkulacije virusa Zapadnog Nila u 2017. godini, virusom Zapadnog Nila u sezoni 2018. godine prikazani su u Tabeli 11.

Tabela 11. Rezultati serološkog ispitivanja junica sa farme „Vojvodina“ Starčevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost junica	Rezultat serološkog pregleda
1	9.10.2018	7106961184	02.11.2017	10 meseci	pozitivno
2	9.10.2018	7156961186	08.11.2017	10 meseci	negativno
3	9.10.2018	7136961187	09.11.2017	10 meseci	negativno
4	9.10.2018	7116961188	09.11.2017	10 meseci	pozitivno
5	9.10.2018	7196961189	11.11.2017	10 meseci	pozitivno
6	9.10.2018	7156961191	11.11.2017	10 meseci	pozitivno
7	9.10.2018	7136961192	13.11.2017	10 meseci	negativno
8	9.10.2018	7166961195	18.11.2017	10 meseci	negativno
9	9.10.2018	7146961196	18.11.2017	10 meseci	negativno
10	9.10.2018	7106961198	23.11.2017	10 meseci	negativno
11	9.10.2018	7137058150	11.01.2018	8 meseci	negativno
12	9.10.2018	7197058152	13.01.2018	8 meseci	pozitivno
13	9.10.2018	7137017490	06.01.2018	8 meseci	pozitivno
14	9.10.2018	7117017491	06.01.2018	8 meseci	pozitivno
15	9.10.2018	7187017497	09.01.2018	8 meseci	pozitivno
16	9.10.2018	7147017499	11.01.2018	8 meseci	pozitivno
17	9.10.2018	7177058153	13.01.2018	8 meseci	pozitivno
18	9.10.2018	7157058154	13.01.2018	8 meseci	negativno
19	9.10.2018	7127058155	15.01.2018	8 meseci	negativno
20	9.10.2018	7187058157	16.01.2018	8 meseci	pozitivno

Legenda: geografske koordinate farme Vojvodina Starčevo N 44,803753 E 20,725773

Iz Tabele 11 može se uočiti da je od 20 junica starosti između 8 i 10 meseci 11 bilo serološki pozitivno što je 55% pozitivnih uzoraka u odnosu na broj ispitanih.

5.4.1.2. Uzorci krvnog seruma teladi, junica i krava – Farma „Stari Tamiš“ u Pančevu

Tokom ispitivanja sa istim ciljem kao što je izvršeno uzorkovanje i ispitivanje uzoraka goveda na fami Vojvodina u Starčevu, a radi isključivanja mogućnosti dobijanja jedinstvenog (slučajnog nalaza), na drugom lokalitetu u okviru Južnobanatskog okruga, farmi „Stari Tamiš“ u Pančevu, izvršeno je prikupljanje 20 uzoraka krvnog seruma krava, zatim 20 uzoraka krvnog seruma junica starosti od 10 meseci i 20 uzoraka junica starosti od 8 meseci. Pored ovoga, izvršeno je prikupljanje 33 uzorka teladi poreklom od majki od kojih je prethodno takođe izvršeno uzimanje uzoraka krvi. Prvo prikupljanje uzoraka krvi teladi bilo je 29.03.2019. godine, ukupno 18 uzoraka (telad uzrasta 2,5 do 3 meseca), dok je drugo prikupljanje bilo 03.6.2019. godine, ukupno 15 uzoraka (ista telad uzrasta 4,5 do 5 meseci). Kao i u prethodnom

slučaju na farmi Vojvodina u Starčevu, uzorkovanje i ispitivanje krvi od teladi u cilju otkrivanja maternalnog imuniteta (protiv virusa Zapadnog Nila) kao i dužine trajanja ovako stečenog imuniteta. Zato su i periodi uzorkovanja teladi (inače svih rođenih u zimu tj nakon sezone vektora iz prethodne godine) bili pre sezone pojave vektora i mogućnosti širenja virusa Zapadnog Nila u 2018. godini, da bi se isključila mogućnost da je nalaz antitela kod njih rezultat njihove infekcije virusom Zapadnog Nila, a ne prisustva maternalnog imuniteta. Precizni podaci o datumu uzorkovanja, brojevima ušnih markica životinja, starosti životinja, podaci koji povezuju krave sa teladima kao i o rezultatima ispitivanja prikazani su u tabeli broj 12.

Prikupljeni uzorci krvnog seruma krava, junica i teladi su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ELISA testom (Tabele 12, 13 i 14 i Grafikon 6). Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma teladi su potvrdili da ni u jednom uzorku krvnog seruma prikupljenih tokom dvokratnog uzimanja uzoraka u uzrastu od 3 i 5 meseci starosti, nije utvrđeno prisustvo maternalnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila.

Ispitivanjem 20 uzoraka krvnog seruma krava (jednokratno prikupljanje uzoraka 15.10.2018.godine) utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 7 krava (35%), dok je 13 krava (65%) bilo negativno. Starosna struktura uzorkovanih krava se kretala od 2. do 5 godina starosti. Rezultati su prikazani u tabeli broj 13.

Tabela 12. Rezultati serološkog ispitivanja teladi sa farme „Stari Tamiš” Pančevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom dva uzorkovanja u 2019. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Starost u mesecima	Uzorkovanje	Rezultat serološkog pregleda	Br. ušne markice majke	Serološki status majke
1	29.3.2019	7154972253	3 meseca	Prvo uzorkovanje	negativno	7114672402	pozitivno
2	29.3.2019	7114972245	3 meseca		negativno	7165304905	negativno
3	29.3.2019	7144972258	3 meseca		negativno	7125297558	negativno
4	29.3.2019	7154972267	2,5 meseca		negativno	7165304533	negativno
5	29.3.2019	7114972274	2,5 meseca		negativno	7165305033	negativno
6	29.3.2019	7124972240	3 meseca		negativno	7194640233	pozitivno
7	29.3.2019	7164972257	3 meseca		negativno	7124708778	pozitivno
8	29.3.2019	7114972269	2,5 meseca		negativno	7175304976	negativno
9	29.3.2019	7184972256	3 meseca		negativno	7174647004	negativno
10	29.3.2019	7194972326	2 meseca		negativno	7184331725	pozitivno
11	29.3.2019	7154972314	2 meseca		negativno	7124733184	pozitivno
12	29.3.2019	7114972325	2 meseca		negativno	7104627655	pozitivno
13	29.3.2019	7184972275	2,5 meseca		negativno	7105299836	negativno
14	29.3.2019	7114972250	3 meseca		negativno	7175304962	negativno
15	29.3.2019	7124972278	2,5 meseca		negativno	7175305023	pozitivno
16	29.3.2019	7184972242	3 meseca		negativno	7196702134	negativno
17	29.3.2019	7104972241	3 meseca		negativno	7155304920	negativno
18	29.3.2019	7104972255	3 meseca		negativno	7124592730	negativno

Tabela 12. (nastavak) Rezultati serološkog ispitivanja teladi sa farme „Stari Tamiš” Pančevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom dva uzorkovanja u 2019. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Starost u mesecima	Uzorkovanje	Rezultat serološkog pregleda	Br. ušne markice majke	Serološki status majke
19	03.6.2019	7154972253	5 meseci	Drugo uzorkovanje	negativno	7114672402	pozitivno
20	03.6.2019	7144972258	5 meseci		negativno	7125297558	negativno
21	03.6.2019	7154972267	5 meseci		negativno	7165304533	negativno
22	03.6.2019	7114972274	4,5 meseca		negativno	7165305033	negativno
23	03.6.2019	7124972240	5 meseci		negativno	7194640233	pozitivno
24	03.6.2019	7114972269	5 meseci		negativno	7175304976	negativno
25	03.6.2019	7194972326	4 meseca		negativno	7184331725	pozitivno
26	3.6.2019	7154972314	4 meseca		negativno	7124733184	pozitivno
27	3.6.2019	7114972325	4 meseca		negativno	7104627655	pozitivno
28	3.6.2019	7184972275	4,5 meseca		negativno	7105299836	negativno
29	3.6.2019	7114972250	5 meseca		negativno	7175304962	negativno
30	3.6.2019	7124972278	4,5 meseca		negativno	7175305023	pozitivno
31	3.6.2019	7184972242	5 meseci		negativno	7196702134	negativno
32	3.6.2019	7104972241	5 meseci		negativno	7155304920	negativno
33	3.6.2019	7104972255	5 meseci		negativno	7124592730	negativno

Legenda: geografske koordinate farme Stari Tamiš, Pančevo N 44,870511 E 20,763442

Tabela 13. Rezultati serološkog ispitivanja krava sa farme „Stari Tamiš“ Pančevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost krava	Rezultat serološkog pregleda
1	15.10.2018	7114672402	30.05.2014	52 meseca	pozitivno
2	15.10.2018	7165304905	17.08.2016	26 meseci	negativno
3	15.10.2018	7125297558	20.11.2015	35 meseci	negativno
4	15.10.2018	7165304533	04.09.2016	25 meseci	negativno
5	15.10.2018	7165305033	30.10.2016	24 meseci	negativno
6	15.10.2018	7194640233	02.11.2013	59 meseci	pozitivno
7	15.10.2018	7124708778	30.12.2014	46 meseci	pozitivno
8	15.10.2018	7114627495	14.09.2013	61 mesec	negativno
9	15.10.2018	7175304976	23.09.2016	25 meseci	negativno
10	15.10.2018	7174647004	09.01.2014	57 meseci	negativno
11	15.10.2018	7184331725	12.03.2013	67 meseci	pozitivno
12	15.10.2018	7124733184	04.08.2015	38 meseci	pozitivno
13	15.10.2018	7104627655	25.10.2013	48 meseci	pozitivno
14	15.10.2018	7105299836	04.08.2016	26 meseci	negativno
15	15.10.2018	7175304962	18.09.2016	25 meseci	negativno
16	15.10.2018	7175305023	24.10.2016	24 meseca	pozitivno
17	15.10.2018	7165305028	27.10.2016	24 meseca	negativno
18	15.10.2018	7196702134	06.07.2016	27 meseci	negativno
19	15.10.2018	7155304920	11.09.2016	25 meseci	negativno
20	15.10.2018	7124592730	03.02.2013	68 meseci	negativno

Legenda: geografske koordinate farme Stari Tamiš, Pančevo N 44,870511 E 20,763442

U uzorcima krvnih seruma junica starosti 8 meseci utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela kod 9 (45%) životinja od ukupno ispitanih 20 junica. U uzorcima krvnih seruma junica starosti 10 meseci, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je ustanovljeno kod 5 (25%) junica, dok je preostalih 15 uzoraka bilo negativno. Rezultati ovih ispitivanja koja su nastala kao odgovor na infekciju mladih jedinki, rođenih nakon sezone cirkulacije virusa Zapadnog Nila u 2017. godini, virusom Zapadnog Nila u sezoni 2018. godine prikazani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Rezultati serološkog ispitivanja junica sa farme „Stari Tamiš“ Pančevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost junica	Rezultat serološkog pregleda
1	15.10.2018	7184971643	18.11.2017	10 meseci	pozitivno
2	15.10.2018	7134971631	14.11.2017	10 meseci	negativno
3	15.10.2018	7114971613	07.11.2017	10 meseci	negativno
4	15.10.2018	7184971596	01.11.2017	10 meseci	negativno
5	15.10.2018	7124971599	02.11.2017	10 meseci	negativno
6	15.10.2018	7164971644	19.11.2017	10 meseci	negativno
7	15.10.2018	7174971629	13.11.2017	10 meseci	negativno
8	15.10.2018	7124971603	03.11.2017	10 meseci	negativno
9	15.10.2018	7154971606	04.11.2017	10 meseci	pozitivno
10	15.10.2018	7164971620	10.11.2017	10 meseci	negativno
11	15.10.2018	7164971639	17.11.2017	10 meseci	negativno
12	15.10.2018	7144971635	16.11.2017	10 meseci	pozitivno
13	15.10.2018	7184971600	02.11.2017	10 meseci	pozitivno
14	15.10.2018	7184971662	27.11.2017	10 meseci	negativno
15	15.10.2018	7104971637	16.11.2017	10 meseci	negativno
16	15.10.2018	7194971652	22.11.2017	10 meseci	pozitivno
17	15.10.2018	7104971595	01.11.2017	10 meseci	negativno
18	15.10.2018	7114971651	21.11.2017	10 meseci	negativno
19	15.10.2018	7154971593	01.11.2017	10 meseci	negativno
20	15.10.2018	7134971626	13.11.2017	10 meseci	negativno

Tabela 14. (nastavak) Rezultati serološkog ispitivanja junica sa farme „Stari Tamiš“ Pančevo na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost junica	Rezultat serološkog pregleda
21	15.10.2018	7154971809	28.01.2018	8 meseci	negativno
22	15.10.2018	7194971751	02.01.2018	8 meseci	pozitivno
23	15.10.2018	7104971784	16.01.2018	8 meseci	pozitivno
24	15.10.2018	7124971801	23.01.2018	8 meseci	negativno
25	15.10.2018	7184971799	22.01.2018	8 meseci	negativno
26	15.10.2018	7134971768	08.01.2018	8 meseci	pozitivno
27	15.10.2018	7164971762	05.01.2018	8 meseci	negativno
28	15.10.2018	7134971787	17.01.2018	8 meseci	negativno
29	15.10.2018	7154971767	08.01.2018	8 meseci	negativno
30	15.10.2018	7124971778	13.01.2018	8 meseci	pozitivno
31	15.10.2018	7194971770	08.01.2018	8 meseci	negativno
32	15.10.2018	7184971761	05.01.2018	8 meseci	pozitivno
33	15.10.2018	7114971769	08.01.2018	8 meseci	pozitivno
34	15.10.2018	7194971807	27.01.2018	8 meseci	negativno
35	15.10.2018	7174971785	16.01.2018	8 meseci	pozitivno
36	15.10.2018	7114971774	10.01.2018	8 meseci	negativno
37	15.10.2018	7104971760	05.01.2018	8 meseci	negativno
38	15.10.2018	7184971775	10.01.2018	8 meseci	pozitivno
39	15.10.2018	7174971790	19.01.2018	8 meseci	pozitivno
40	15.10.2018	7184971756	04.01.2018	8 meseci	negativno

Legenda: geografske koordinate farme Stari Tamiš, Pančevo N 44,870511 E 20,763442

5.4.1.3. Uzorci krvnog seruma teladi, junica i krava – Farma „Zlatar”, Mramorak, opština Kovin

Prikupljanje uzoraka krvnog seruma krava, junica i teladi je sprovedeno i na farmi „Zlatar“ u selu Mramorak, opština Kovin. Prikupljeno je 5 uzoraka krvnog seruma krava, odnosno po 5 uzoraka junica starosti od 8 meseci i od 10 meseci. Takođe, prikupljeno je i 10 uzoraka krvnog seruma od pet teladi (dvokratno prikupljanje uzoraka 29.03.2019. godine u uzrastu teladi od 2 do 2,5 meseci i 3.06.2019. godine kod istih teladi u uzrastu od 4 do 4,5 meseci). Precizni podaci o datumu uzorkovanja, brojevima ušnih markica životinja, starosti, podaci koji povezuju krave sa teladima kao i podaci o rezultatima ispitivanja prikazani su u tabeli broj 15.

Prikupljeni uzorci krvnog seruma krava, junica i teladi su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA (Tabele 15, 16 i 17 i Grafikon 5). Rezultati ispitivanja su potvrdili da je u jednom uzorku krvnog seruma teleta iz prvog uzorkovanja (29.03.2019.godine, telad uzrasta 2 do 2,5 meseca) utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, dok su ostala telad bila seronegativna. Ovde treba naglasiti da je seropozitivno tele (starost 62 dana) bilo poreklom od seropozitivne majke. Ispitivanjem uzoraka krvnog seruma istih teladi uzrasta 4 do 4,5 meseci prikupljenih tokom drugog uzorkovanja (03.6.2019. godine) je utvrđeno da su sva telad bila seronegativna.

Tabela 15. Rezultati serološkog ispitivanja teladi sa farme „Zlatar“ Mramorak na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila tokom dva uzorkovanja u 2019. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Starost u mesecima	Uzorkovanje	Rezultat serološkog pregleda	Br. ušne marke majke	Serološki status majke
1	29.3.2019	7144989980	2,5 meseca	Prvo uzorkovanje	negativno	7104715402	negativno
2	29.3.2019	7184989983	2 meseca		negativno	7135297850	pozitivno
3	29.3.2019	7134989985	2 meseca		negativno	7125299675	pozitivno
4	29.3.2019	7114989986	2 meseca		negativno	7164725549	negativno
5	29.3.2019	7114989991	2 meseca		pozitivno	7175299871	pozitivno
6	3.6.2019	7144989980	4,5 meseci	Drugo uzorkovanje	negativno	7104715402	negativno
7	3.6.2019	7184989983	4,5 meseca		negativno	7135297850	pozitivno
8	3.6.2019	7134989985	4,5 meseca		negativno	7125299675	pozitivno
9	3.6.2019	7114989986	4,5 meseca		negativno	7164725549	negativno
10	3.6.2019	7114989991	4 meseca		negativno	7175299871	pozitivno

Legenda: geografske koordinate farme Zlatar, Mramorak N 44,883191 E 20,959907

Ispitivanjem 5 uzoraka krvnog seruma krava (jednokratno prikupljanje uzoraka 27.09.2018. godine) utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 3 (60%) uzorka krvnog seruma, dok su 2 uzorka krvnog seruma krava bili negativni. Starosna struktura krava se kretala od 2 do 4 godine starosti. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli broj 16.

Tabela 16. Rezultati serološkog ispitivanja krava sa farme „Zlatar“ Mramorak na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost krave	Rezultat serološkog pregleda
1	27.9.2018	7164725549	30.6.2015	39 meseci	negativno
2	27.9.2018	7125299675	28.6.2016	27 meseci	pozitivno
3	27.9.2018	7175299871	29.6.2016	27 meseci	pozitivno
4	27.9.2018	7135297850	11.6.2016	27 meseci	pozitivno
5	27.9.2018	7104715402	19.4.2015	41 mesec	negativno

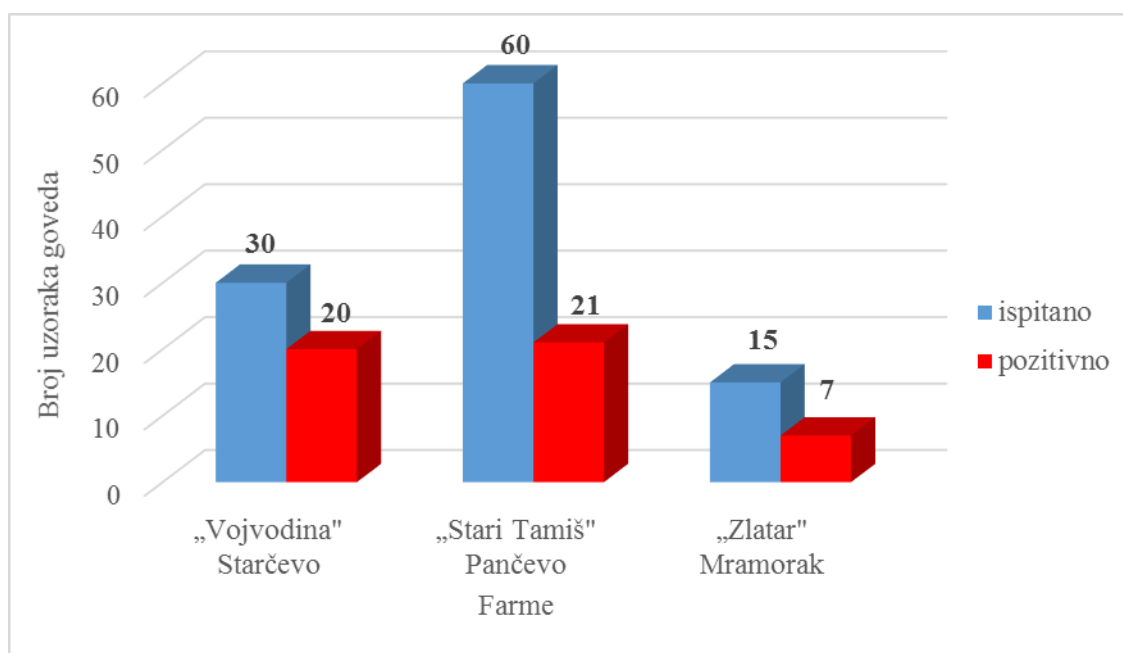
Legenda: geografske koordinate farme Zlatar, Mramorak N44,883191 E20,959907

U uzorcima krvnog seruma junica starosti od 8 meseci utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela kod 1 (20%) od 5 životinja. U uzorcima krvnog seruma junica starosti od 10 meseci, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je ustanovljeno kod 3 (60%) junice dok su preostale 2 bile negativne. Rezultati ovih ispitivanja koja su nastala kao odgovor na infekciju mladih jedniki, rođenih nakon sezone cirkulacije virusa Zapadnog Nila u 2017. godini, virusom Zapadnog Nila u sezoni 2018.godine prikazani su u Tabeli 17.

Tabela 17. Rezultati serološkog ispitivanja junica sa farme „Zlatar” Mramorak na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

RB uzorka	Datum uzorkovanja	Br. ušne markice	Datum rođenja	Starost junica	Rezultat serološkog pregleda
1	27.9.2018	7154971442	06.11.2017	10 meseci	pozitivno
2	27.9.2018	7114971420	03.10.2017	10 meseci	negativno
3	27.9.2018	7164971446	09.11.2017	10 meseci	pozitivno
4	27.9.2018	7174971455	16.11.2017	10 meseci	pozitivno
5	27.9.2018	7194971421	07.10.2017	10 meseci	negativno
6	27.9.2018	7194970596	06.01.2018	8 meseci	negativno
7	27.9.2018	7124970608	13.01.2018	8 meseci	pozitivno
8	27.9.2018	7184970610	14.01.2018	8 meseci	negativno
9	27.9.2018	7194970619	22.01.2018	8 meseci	negativno
10	27.9.2018	7164970630	29.01.2018	8 meseci	negativno

Legenda: geografske koordinate farme Zlatar, Mramorak N 44,883191 E 20,959907



Grafikon 5. Uporedni prikaz rezultata ispitanih i pozitivnih uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini sa farmi goveda u Južnobanatskom okrugu

Na Grafikonu 5 prikazan je ukupan broj ispitanih krvi goveda na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila i rezultat tih ispitivanja. Uočava se da je na sve tri farme utvrđeno prisustvo antitela u krvi goveda, a najviša seroprevalencija ustanovljena je na farmi u Starčevu i iznosila je 66,7%. Seroprevalencija u Mramorku je iznosila 46,7%, a na farmi Stari Tamiš u Pančevu 35%. U obzir, takođe, treba uzeti i broj

ispitanih uzoraka koji je bio najveći na farmi „Stari Tamiš“ i čak 4 puta veći u odnosu na farmu „Zlatar“ u Mramorku i dvostruko veći od broja uzoraka na farmi „Vojvodina“ u Starčevu. Sa druge strane, frakcija uzorka (broj uzorkovanih u odnosu na ukupan broj životinja na ispitivanim farmama) nije bio ujednačen. Iz tog razloga, dobijene vrednosti seroprevalencije treba posmatrati kao uslovne tj. relativne. Istovremeno, razlika u seoprevalenciji može biti rezultat različitog intenziteta cirkulacije virusa Zapadnog Nila na pojedinim lokalitetima i mikrolokalitetima.

5.4.1.4. Rezultati ispitivanja prisustva maternalnih antitela u serumu teladi sa farmi u Starčevu, Starom Tamišu i Mramorku

U Tabeli 18 prikazani su rezultati ispitivanja prisustva maternalnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod teladi na farmama „Vojvodina“ u Starčevu, „Stari Tamiš“ u Pančevu i „Zlatar“ u Mramorku. Ukupno su ispitana 33 teleta, starosti kod prvog uzorkovanja od 2 do 3 meseca. Na početku studije krv je uzeta od 33 teleta, dok je istraživanje završeno sa 30 jedinki, zato što su tri teleta isključena iz studije. Za istraživanje su izabrana telad koja su poticala od majki različitog serološkog statusa. Krv teladi je uzorkovana dva puta od istih jedinki u razmaku od 2 meseca. Serološkim ispitivanjem seruma teladi utvrđeno je da nakon period od 3 i više meseca po rođenju titar specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ispod praga detekcije ELISA testa.

Tabela 18. Zbirni rezultati seroloških ispitivanja prisustva specifičnih maternalnih antitela protiv virusa zapadnog Nila u serumima teladi uzorkovanim na farmama „Vojvodina“ Starčevo, „Stari Tamiš“ Pančevo i „Zlatar“ Mramorak u Južnobanatskom okrugu u 2019. godini

Redni broj testiranja	Ukupno ispitane teladi	Starost teladi (u mesecima)	Ukupan broj seropozitivne teladi	Procenat seropozitivne teladi
I	10	2	1	10,00
I	11	2,5	1	9,09
I	12	3	0	0,00
II	10	4	0	0,00
II	11	4,5	0	0,00
II	9	5	0	0,00

5.4.2. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma svinja

Ispitivanje uzoraka krvnih seruma svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je, kao i u slučaju kod goveda, vršeno u cilju utvrđivanja mogućnosti korišćenja svinja kao životinjske vrste za sentinel životinje za praćenje prisustva i cirkulacije virusa Zapadnog Nila u pripodi. Pitanja na koja je trebalo odgovoriti su da li svinje mogu biti inficirane virusom Zapadnog Nila, odnosno odgovoriti serološki na infekciju sintezom specifičnih merljivih antitela u krvi na području u kojem je virus Zapadnog Nila prisutan i cirkuliše tokom više godina i kolika je seroprevalencija kod životinja, kao i da li postoje razlike između svinja koje se gaje u intenzivnoj proizvodnji

(komercijalnim farmama sa regulisanom ventilacijom i određenim biosigurnosnim merama) u odnosu na svinje gajene na ekstenzivan način u individualnim gazdinstvima.

5.4.2.1. Uzorci krvnog seruma svinja – svinje sa farmi

U cilju realizacije ispitivanja izvršeno je prikupljanje 62 uzorka krvnog seruma svinja poreklom sa farmi intenzivnog uzgoja na liniji klanja na tri klanice. Detaljne informacije o broju prikupljenih uzoraka sa pojedinačnih farmi, odnosno o datumu uzorkovanja, starosnim kategorijama svinja kao i rezultatima ispitivanja prikazane su u Tabeli broj 19 i Grafikonu 6.

Prikupljeni uzorci krvnog seruma svinja su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo specifičnih antitela kod 5 svinja (8,06%) od kojih su dva uzorka poreklom od svinja iz Mačvanskog Pričinovića, jedan pozitivan uzorak svinje poreklom sa farme „Lekić“, Kruščica, odnosno dva pozitivna uzorka svinja poreklom sa farme „Delta“ iz Vladimirovca. Od ispitivanih svinja koje su vodile poreklo sa 7 farmi, prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila je utvrđeno kod svinja sa 3 farme i tu u procentu od 16,7% (1/6) do 33,3% (2/6) ispitanih svinja.

Treba naglasiti da su pozitivni uzorci krvnog seruma svinja poreklom od životinja koje su smeštene na lokacijama u tri različite opštine.

Tabela 19. Rezultati serološkog ispitivanja svinja sa farmi intenzivnog uzgoja na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini

Datum uzorkovanja	Opština	Naseljeno mesto	Vlasnik	Starost	Nalaz pozit / ispit
Klanica „Plavi Dunav” Pančevo					
25.9.2018	Pančevo	Pančevo	Stari Tamiš	7 meseci	0/10
27.9.2018	Subotica	Kelebija	-	7 meseci	0/10
26.10.2018	Stara Pazova	Stara Pazova	Delta	7 meseci	0/10
29.10.2018	Alibunar	Vladimirovac	Delta	7 meseci	2/10
Klanica „Moricz” Jermenovci					
01.10.2018	Bela Crkva	Kruščica	Lekić	7 meseci	1/6
01.11.2018	Bela Crkva	Banatska Subotica	Agrovirt	8 meseci	0/10
Klanica „Cicvarić” Sefkerin					
27.9.2018	Bogatić	Mačvanski Pričinović	-	7 meseci	2/6
Ukupno	6	7	7		5 / 62

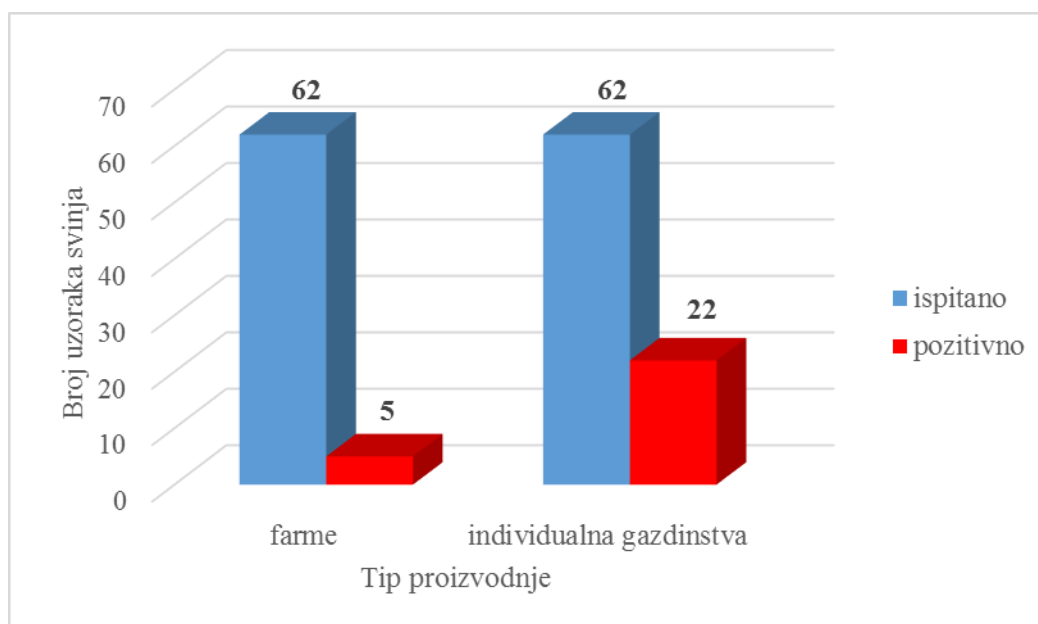
5.4.2.2. Uzorci krvnog seruma svinja – individualna gazdinstva

Tokom ovih ispitivanja na liniji klanja je izvršeno je prikupljanje 62 uzorka krvnog seruma svinja koje su gajene u individualnim gazdinstvima. Od svinja sa teritorije opštine Pančevo je prikupljeno ukupno 39 uzoraka svinja (14 individualnih gazinstava), zatim od svinja sa teritorije opštine Plandište ukupno 17 uzoraka krvnog seruma (4 individualna gazdinstva) i od svinja sa teritorije opštine Opovo ukupno 6

uzoraka seruma (3 individualna gazdinstva). Precizni podaci o datumu uzorkovanja, starosti i poreklu životinja kao i o rezultatima ispitivanja prikazani su u Tabeli broj 20 i Grafikonu 6.

Svi prikupljeni uzorci krvnog seruma svinja su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA. Od 62 ispitivana, kod 22 (35,48%) uzorka je utvrđeno prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. U opštini Plandište od ukupno 17 ispitanih uzoraka seruma, prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila je utvrđeno kod dva (11,76%) uzorka seruma u dva pojedinačna individualna gazdinstva (50%). U opštini Opovo ukupno je ispitano 6 uzoraka krvnog seruma od kojih je 1 (16,67%) uzorak seruma bio pozitivan. Na teritoriji opštine Pančevo (Starčevo, Omoljica) prikupljeno je 39 uzoraka svinja od kojih je 19 (48,72%) uzoraka bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila koji su bili poreklom od svinja iz 9 (69,23%) ispitivanih individualnih gazdinstava. Većina svinja kod kojih je utvrđeno prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila je bila poreklom iz opštine Pančevo, od čega iz sela Starčevo ukupno 18 (18/35; 52,43%) pozitivnih svinja a samo jedna (1/4; 25%) pozitivna svinja iz naseljenog mesta Omoljica.

U nekim individualnim gazdinstvima pored pozitivnih svinja, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je bilo ustanovljeno i kod živine. Takođe, pored ovoga, u jednom gazdinstvu, gde je prethodno utvrđeno prisustvo antitela kod svinja i živine, potvrđeno je i prisustvo virusne nukleinske kiseline genoma virusa Zapadnog Nila u prikupljenim uzorcima komaraca.



Grafikon 6. Uporedni prikaz rezultata ispitanih uzoraka krvnog seruma svinja na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini između svinja sa farmi i individualnih gazdinstava u Južnobanatskom okrugu

Na Grafikonu 6 prikazan je broj ispitanih svinja i rezultat ispitivanja na prisustvo antitela kod svinja. Ispitan je identičan broj uzoraka krvi svinja sa farmi i iz individualnih gazdinstava. Može se uočiti da je broj serološki pozitivnih svinja veći na individualnom sektoru 22 (35,48%), u odnosu na farme, kod kojih su utvrđena antitela kod 5 svinja (8,06%). Ovakvi rezultati su posledica kontakata svinja sa inficiranim komarcima, koji su mnogo manje zastupljeni u objektima na farmama zbog postojanja biosigurnosnih mera (automatska ventilacija, mreže protiv insekata, vazdušne zavese).

Tabela 20. Rezultati serološkog ispitivanja svinja sa individualnih gazdinstava na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum uzorkovanja	Opština	Naseljeno mesto	Starost	Nalaz pozit / ispit
Klanica „Moricz“ Jermenovci				
01.10.2018.	Plandište	Jermenovci	7 meseci	1/7
08.10.2018.	Plandište	Hajdučica	7 meseci	1/4
08.10.2018.	Plandište	Plandište	7 meseci	0/4
08.10.2018.	Plandište	Stari Lec	7 meseci	0/2
Klanica „Plavi Dunav“ Pančevo				
25.9.2018	Pančevo	Pančevo	7 meseci	0/10
Klanica „Cicvarić“ Sefkerin				
28.12.2018.	Opovo	Sefkerin	8 meseci	1/6
Klanje u gazdinstvu				
29.9.2018.	Pančevo	Starčevo 1	9 meseci	2/2
05.10.2018.	Pančevo	Starčevo 2	10 meseci	1/1
14.10.2018.	Pančevo	Starčevo 3	4,5 meseca	1/4
16.11.2018.	Pančevo	Starčevo 4	3.5 meseca	7/9
26.11.2018.	Pančevo	Omoljica 1	8 meseci	1/1
01.12.2018.	Pančevo	Starčevo 5	8 meseci	2/2
02.12.2018.	Pančevo	Starčevo 6	10 meseci	1/1
03.12.2018.	Pančevo	Omoljica 2	9 meseci	0/1
06.12.2018.	Pančevo	Starčevo 7	10 meseci	0/2
13.12.2018.	Pančevo	Omoljica 3	9 meseci	0/2
15.12.2018.	Pančevo	Starčevo 8	10 meseci	2/2
20.12.2018.	Pančevo	Starčevo 9	8 meseci	2/2
Ukupno	3	7		22 / 62

Legenda: lokacije individualnih gazdinstava lokacije gde je uzorkovana krv svinja

Starčevo 1 - Starčevo, Matije Gupca 47

Starčevo 2 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 54

Starčevo 3 - Starčevo, Lenjinova 54

Starčevo 4 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 61

Starčevo 5 - Starčevo, Matije Gupca 51

Starčevo 6 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 52

Starčevo 7 - Starčevo, Omladinska 3

Starčevo 8 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 60

Starčevo 9 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 50

Omoljica 1 – Omoljica, Vojvodanska 58

Omoljica 2 – Omoljica, Maršala Tita 62

Omoljica 3 – Omoljica, Stefana Nemanje 12

5.4.3. Ispitivanje uzoraka krvnih seruma živine

Ispitivanje uzoraka krvnih seruma domaće živine - kokošaka na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila je vršeno u cilju utvrđivanja mogućnosti korišćenja živine kao sentinel vrste za praćenje prisustva i cirkulacije virusa Zapadnog Nila u prirodi u našim uslovima. Naime, domaća živine je odavno prepoznata i korišćena kao sentinel vrsta za praćenje prisustva virusa Zapadnog Nila, s obzirom da je živina (kao vrsta ptica) veoma prijemčiva na infekciju ovim virusom. Pitanja na koja je trebalo odgovoriti su kolika je prevalencija jedinki sa antitelima protiv virusa Zapadnog Nila u populaciji živine na području u kojem je virus Zapadnog Nila prisutan i cirkuliše tokom više godina, kao i da li postoje razlike u prevalenciji između živine koja se gaji u intenzivnoj proizvodnji (komercijalnim farmama sa regulisanom ventilacijom i određenim biosigurnosnim merama) u odnosu na živinu gajenu na ekstenzivan način u dvorištima individualnih.

5.4.3.1. Uzorci krvnog seruma živine – živina sa farmi

U cilju sprovođenja ovih ispitivanja izvršeno je prikupljanje 69 uzoraka krvnog seruma živine sa 6 komercijalnih farmi na teritoriji Južnobanatskog okruga, od kojih se na 5 farmi živina drži u zatvorenim objektima, a na jednoj organskoj farmi živina se drži u objektima i ispustima. Precizniji podaci o broju prikupljenih uzoraka sa svake farme živine, zatim o starosti živine i datum uzorkovanja, proizvodnoj kategoriji kao i o rezultatima ispitivanja prikazani su u Tabeli 21 i Grafikonu 7.

Svi prikupljeni uzorci su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom metode ELISA. Dobijeni rezultati su potvrdili da ni u jednom uzorku krvnog seruma živine nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Živina od koje su uzimani uzorci je bila izležena posle 1.12.2017. godine. Ovaj podatak je od velike važnosti s obzirom na to da da živina od koje je vršeno prikupljanje uzoraka nije bila u kontaktu sa komarcima pre sezone povećane aktivnosti komaraca 2018. godine.

Tabela 21. Rezultati serološkog ispitivanja živine poreklom sa farmi na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum uzorkov.	Opština	Naseljeno mesto	Vlasnik	Proizvodna kategorija	Starost živine	Nalaz pozit / ispit
09.10.2018	Pančevo	Pančevo	Dabić	koke nosilje	4 meseca	0/10
10.10.2018	Alibunar	Ilandža	Presija	koke nosilje	11 meseci	0/10
18.10.2018	Pančevo	Banatsko N. Selo	Timkok	koke nosilje	8 meseci	0/10
21.10.2018	Opovo	Opovo	Vasiljev	brojleri	50 dana	0/9
01.11.2018	Vršac	Vatin	Timkok	koke nosilje	4 meseci	0/20
14.11.2018	Alibunar	Seleuš	Kumbarić Suad	koke nosilje organska proizv	6 meseci	0/10
Ukupno	/	/	/	6 farmi	2-11 mes.	0 / 69

5.4.3.2. Uzorci krvnog seruma živine – individualna gazdinstva

Od živine poreklom iz individualnih seoskih gazdinstava sa teritorije opštine Pančevo (ukupno 5 ekonomskih dvorišta) prikupljeno je 40 uzoraka seruma živine. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je 20 (20/40; 50%) ispitanih uzoraka živine bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila i to na 3 od 5 ispitanih gazdinstava (57,14%). Svi pozitivni uzorci krvnog seruma živine na teritoriji opštine Pančevo su poticali iz tri (3/4; 80%) individualna gazdinstva u naseljenom mestu Starčevo (20/24; 83,33% seropozitivnih jedinki), od kojih je u dva dvorišta utvrđeno prisustvo antitela protiv navedenog virusa i u uzorcima poreklom od svinja.

Na teritoriji opštine Opovo izvršeno je prikupljanje uzoraka krvnog seruma živine poreklom od 16 životinja poreklom iz dva individualna gazdinstva. Rezultati ispitivanja su potvrdili da je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila bilo potvrđeno kod dva uzorka krvnog seruma živine (2/16; 12,5%) poreklom iz jednog domaćinstva (1/2; 50%).

Od ukupno ispitane živine u ekstenzivnom uzgoju, utvrđeno je 39,29% (22/56) jedinki sa antitelima protiv virusa Zapadnog Nila. Precizniji podaci o broju prikupljenih uzoraka živine sa individualnih gazdinstava, zatim o starosti živine i datumu uzorkovanja, odnosno o rezultatima ispitivanja prikazani su u Tabeli broj 22 i Grafikonu 7. Uzorkovana živina sa individualnih gazdinstava je takođe bila izležena posle 1.12.2017. godine.

Tabela 22. Rezultati serološkog ispitivanja živine poreklom iz individualnih gazdinstava na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum uzorkovanja	Opština	Naseljeno mesto	Proizvodna kategorija	Starost živine	Nalaz pozit / ispit
9.10.2018.	Pančevo	Starčevo 10	koke nosilje	10 meseci	9/10
20.10.2018.	Pančevo	Starčevo 4	domaće koke	6 meseci	4/7
20.10.2018.	Pančevo	Starčevo 9	koke nosilje	10 meseci	7/7
05.11.2018.	Opovo	Opovo	domaće koke	6 meseci	0/10
05.11.2018.	Pančevo	Ivanovo	domaće koke	5 meseci	0/6
13.11.2018.	Pančevo	Starčevo 3	domaće koke	4 meseca	0/10
14.11.2018.	Opovo	Sefkerin	koke nosilje	6 meseci	2/6
Ukupno	/	/	/	4-10 mes.	22/ 56

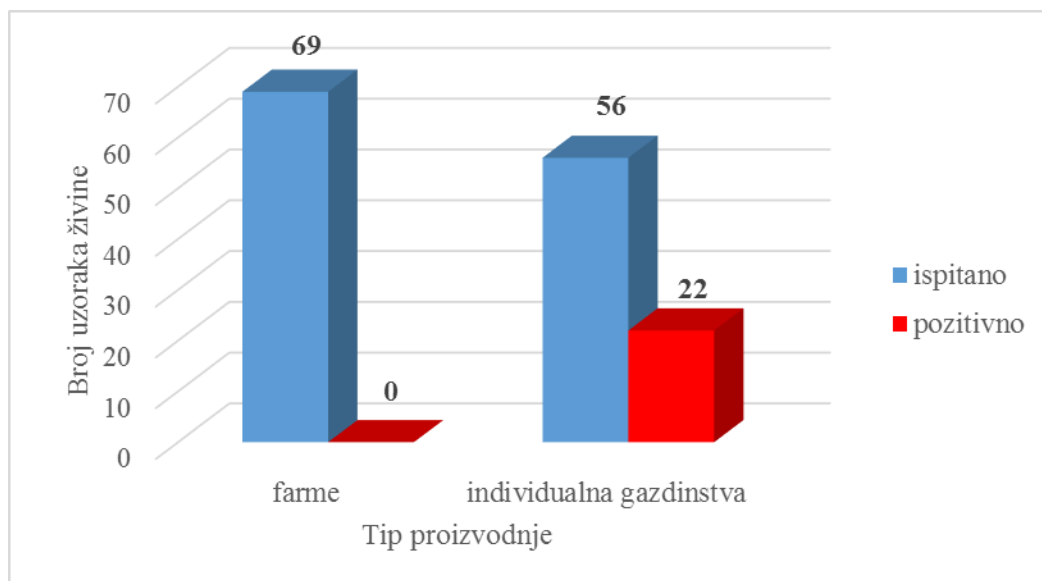
Legenda: lokacije individualnih gazdinstava gde je uzorkovana krv živine

Starčevo 10 - Starčevo, Borisa Kidriča 6

Starčevo 4 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 61

Starčevo 9 - Starčevo, Žarka Zrenjanina 50

Starčevo 3 - Starčevo, Lenjinova 54



Grafikon 7. Uporedni prikaz rezultata ispitivanja krvi živine na prisustvo anitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini između živine sa farmi i individualnih gazdinstava u Južnobanatskom okrugu

Na Grafikonu 7 prikazani su rezultati ispitivanja krvnog seruma živine sa farmi i iz individualnog uzgoja. Može se uočiti da su svi uzorci sa farmi živine bili serološki negativni, dok su 22 (39,29%) uzorka krvi poreklom od živine gajene u individualnim gazdinstvima reagovali pozitivno na ELISA testu. Kao i u slučaju ispitivanja sprovedenih kod svinja, ovaj rezultat je posledica kontakta živine sa inficiranim komarcima, koji su retki na farmama zbog postojanja biosigurnosnih mera (automatska ventilacija, mreže protiv insekata, vazdušne zavese), dok sa druge strane živina u ekstenzivnom odgoju u dvorištima je u velikoj meri i u potpunosti izložena komarcima u njihovoj okolini.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja uzoraka komaraca utvrđeno je značajno prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2017. godini, a posebno u 2018. godini na teritoriji na kojoj su vršena ova ispitivanja. Na osnovu toga može se izvesti zaključak o visokom stepenu rizika po ljude i životinje od obolevanja od groznice Zapadnog Nila. Ispitivanjem uzoraka poreklom od konja nije utvrđen veći broj serološki pozitivnih životinja, dok je prisustvo virusa kod divljih ptica bilo gotovo zanemarljivo (jedan pozitivan slučaj). U odnosu na rezultate prisustva virusa Zapadnog Nila kod ljudi primećeno je značajno povećanje broja obolelih u 2018. godini u odnosu na broj obolelih u 2017. godini (63 slučaja u 2018. godini, odnosno 5 slučajeva u 2017. godini). Ovo je u korelaciji sa dobijenim rezultatima ispitivanjima komaraca gde je uočeno povećanje prisustva virusa kod ovih insekata kao vektora infekcije u 2018. godini u odnosu na 2017. godinu. Ovde treba naglasiti da mali broj serološki pozitivnih konja, odnosno odsustvo virusa kod divljih ptica koje su ispitane na teritoriji na kojoj su vršena ova istraživanja, govori da je potrebno izvršiti reviziju odabira sentinel vrsta za sprovođenje budućih monitoringa infekcije izazvane virusom groznice Zapadnog Nila.

5.5. Epidemiološki izveštaji Zavoda za javno zdravlje Pančevo po pitanju groznice Zapadnog Nila kod ljudi

U toku 2017. godine registrovano je ukupno 5 obolelih ljudi od groznice Zapadnog Nila na teritoriji Južnobanatskog okruga prema izveštaju epidemiološke službe Zavoda za javno zdravlje Pančevo iz Pančeva. Oboleli ljudi su bili poreklom iz opština Kovin – 1 slučaj, Vršac – 1 slučaj i Pančevo – 3 slučaja obolelih. Većina ljudi su oboleli u avgustu (3 slučaja), dok je po jedan slučaj oboljevanja registrovan u junu i septembru. Prvi otkriven slučaj oboljenja je prijavljen 1. juna, a poslednji slučaj u sezoni je prijavljen 28. septembra 2017. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli broj 23 i Grafikonu 8.

Tabela 23. Prijava oboljenja groznice Zapadnog Nila kod ljudi u 2017. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum prijave bolesti	Opština	Naseljeno mesto
01.6.2017.	Kovin	Kovin
21.8.2017.	Vršac	Vršac
31.8.2017.	Pančevo	Pančevo
31.8.2017.	Pančevo	Pančevo
28.9.2017.	Pančevo	Pančevo
Ukupno		5

U toku 2018. godine registrovano je ukupno 63 obolelih ljudi od groznice Zapadnog Nila na teritoriji Južnobanatskog okruga prema izveštaju epidemiološke službe Zavoda za javno zdravlje Pančevo iz Pančeva. Oboleli ljudi su bili poreklom iz opština Kovin (12 slučajeva), Opovo (2 slučaja), Alibunar (7 slučajeva), Kovačica (5 slučajeva), Bela Crkva (1 slučaj), Vršac (3 slučaja) i Pančevo (33 slučaja). Prvi otkriven slučaj oboljenja je prijavljen 28. juna, a poslednji slučaj u sezoni je prijavljen 1. oktobra 2018. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli broj 24 i grafikonu 8.

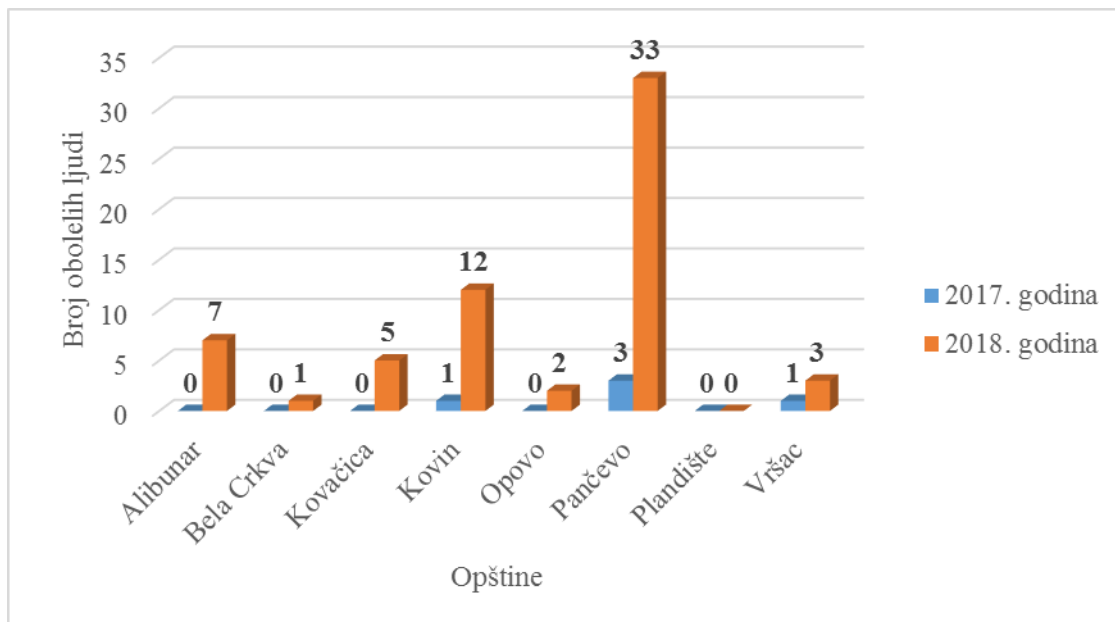
Tabela 24. Prijava oboljenja groznice Zapadnog Nila kod ljudi u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum prijave bolesti	Opština	Naseljeno mesto	Datum prijave bolesti	Opština	Naseljeno mesto
28.6.2018	Pančevo	Pančevo	13.8.2018	Vršac	Uljma
02.7.2018	Pančevo	Pančevo	14.8.2018	Kovačica	Padina
03.7.2018	Pančevo	Pančevo	17.8.2018	Pančevo	Jabuka
03.7.2018	Pančevo	Starčevo	17.8.2018	Pančevo	Pančevo
03.7.2018	Kovin	Kovin	17.8.2018	Kovin	Kovin
13.7.2018	Pančevo	Pančevo	17.8.2018	Kovin	Mramorak
13.7.2018	Pančevo	Pančevo	17.8.2018	Pančevo	Pančevo
13.7.2018	Opovo	Sefkerin	17.8.2018	Pančevo	Jabuka
13.7.2018	Alibunar	Banatski Karlovac	17.8.2018	Pančevo	Dolovo
13.7.2018	Alibunar	Vladimirovac	17.8.2018	Pančevo	Pančevo
20.7.2018	Pančevo	Jabuka	22.8.2018	Kovin	Bavanište
20.7.2018	Pančevo	Pančevo	22.8.2018	Kovin	Gaj
20.7.2018	Pančevo	Pančevo	22.8.2018	Alibunar	Banatski Karlovac
25.7.2018	Pančevo	Pančevo	22.8.2018	Pančevo	Pančevo
25.7.2018	Pančevo	Omoljica	22.8.2018	Pančevo	Pančevo
25.7.2018	Pančevo	Kačarevo	29.8.2018	Kovin	Bavanište
25.7.2018	Pančevo	Pančevo	29.8.2018	Alibunar	Seleuš
26.7.2018	Pančevo	Pančevo	03.9.2018	Alibunar	Banatski Karlovac
30.7.2018	Pančevo	Pančevo	03.9.2018	Pančevo	Pančevo
30.7.2018	Pančevo	Dolovo	03.9.2018	Pančevo	B.N. Selo
30.7.2018	Pančevo	Glogonj	03.9.2018	Kovin	Kovin

Tabela 24. (nastavak) Prijava oboljenja groznice Zapadnog Nila kod ljudi u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Datum prijave bolesti	Opština	Naseljeno mesto	Datum prijave bolesti	Opština	Naseljeno mesto
02.8.2018	Kovačica	Kovačica	05.9.2018	Pančevo	Starčevo
02.8.2018	Kovin	Gaj	05.9.2018	Pančevo	B.N. Selo
02.8.2018	Alibunar	Vladimirovac	05.9.2018	Kovačica	Crepaja
02.8.2018	Kovin	Kovin	05.9.2018	Alibunar	Banatski Karlovac
02.8.2018	Kovin	Kovin	06.9.2018	Vršac	Mali Žam
08.8.2018	Pančevo	Pančevo	07.9.2018	Vršac	Vršac
08.8.2018	Bela Crkva	Dupljaja	17.9.2018	Kovačica	Kovačica
09.8.2018	Opovo	Sefkerin	19.9.2018	Kovačica	Debeljača
09.8.2018	Pančevo	B.N. Selo	21.9.2018	Pančevo	Kačarevo
13.8.2018	Kovin	Kovin	1.10.2018	Kovin	Kovin
13.8.2018	Pančevo	Pančevo			
Ukupno obolelih		63			

Iz Tabela 23 i 24 može se videti da je u 2018. godini registrovano 12,6 puta više obolelih ljudi u odnosu na 2017. godinu. Najveći broj obolelih ljudi od groznice Zapadnog Nila je registrovan u opštini Pančevo, a najmanji u opštini Vršac.

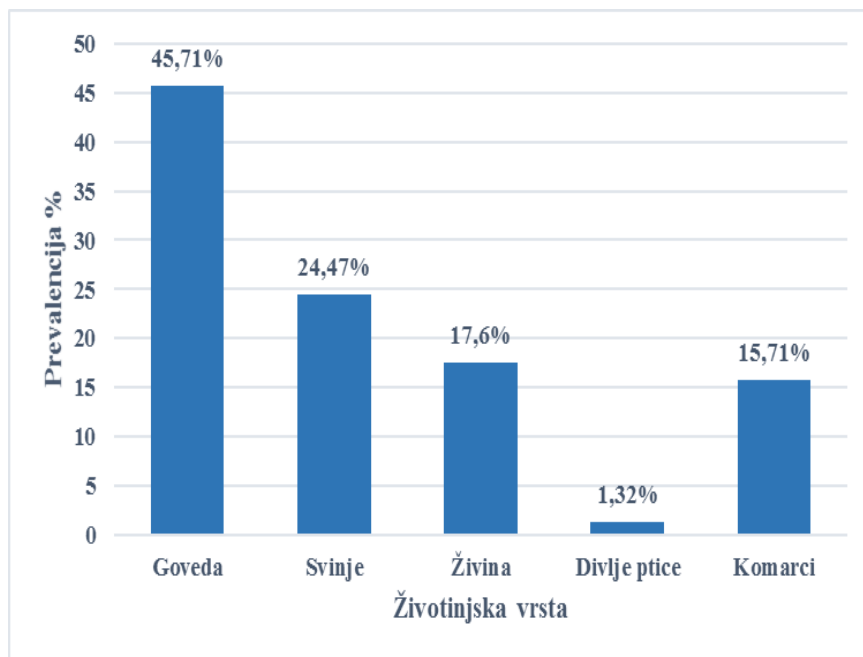


Grafikon 8. Uporedni prikaz ukupnog broja obolelih ljudi od groznice Zapadnog Nila po opštinama u 2017. i 2018. godini na teritoriji Južnobanatskog okruga

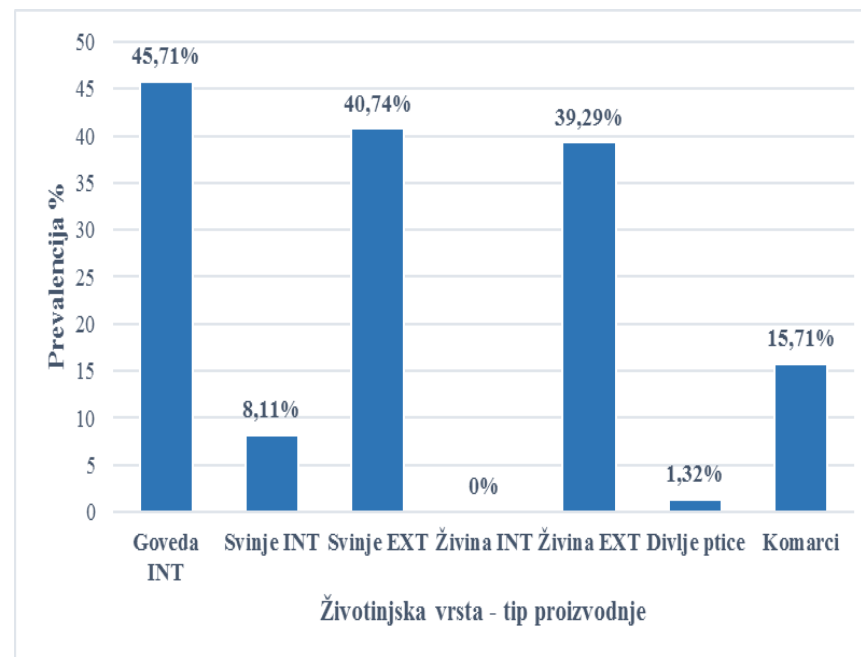
Na Grafikonu 8 prikazani su slučajevi oboljenja ljudi u toku 2017. i 2018. godine po mestima prebivališta i opštinama obolelih osoba. Više od 10 puta je veći broj registrovanih slučajeva oboljenja u 2018. godini u odnosu na 2017. godinu, a više od polovine je iz opštine Pančevo. Može se zapaziti da je u opštini Pančevo i u 2017. godini bilo najviše registrovanih slučajeva na teritoriji Južnog Banata.

5.6. Deskriptivna analiza epizootioloških indikatora infekcije virusom Zapadnog Nila

Analizirani su osnovni epizootiološki indikatori kao što su učestalost infekcije (stopa incidencije) i prevalencija perioda kod različitih vrsta životinja: konji, goveda, svinje, živina i divlje ptice. Na grafikonu 10. panel a) prikazane su vrednosti prevalencije infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja, divljih ptica i kod komaraca. Na panelu b) istog grafikona, prikazane su vrednosti prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja, pri čemu je stratifikacija izvršena je na osnovu načina držanja životinja (ekstenzivni i intenzivni načini držanja životinja). Upoređivanjem prevalencija, utvrđena statistički značajno viša prevalencija kod domaćih životinja koje se gaje na ekstenzivan način.



a) Prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod domaćih životinja u 2018. godini. Na grafikonu je prikazan i procenat pozitivnih uzoraka komaraca ispitanih na prisustvo virusa Zapadnog Nila



b) Prikaz seroprevalencije kod različitih vrsta domaćih životinja stratifikovanih na osnovu načina gajenja. Na grafikonu su prikazani i rezultati Real Time PCR na prisustvo virusa Zapadnog Nila kod divljih ptica. (INT- intenzivni način proizvodnje – farme; EXT – ekstenzivni način proizvodnje – individualna gazdinstva).

Grafikon 9. Prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod domaćih i divljih životinja ispitanih u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

U Tabeli 25. dat je odnos prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja držanih u različitim uslovima proizvodnje. Prikazani su rezultati ocene povezanosti identifikovanog faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila (način proizvodnje domaćih životinja) i prevalencije infekcije/serokonverzije kod domaćih životinja na virus Zapadnog Nila. Iz tabele se vidi da postoji statički značajna mera povezanosti između načina držanja domaćih životinja i prisustva specifičnih antitela i to pre svega kod životinja gajenih na ekstenzivni način. Kao posebno značajni stratumi ističu se svinje i živina gajeni u ekstenzivnim uslovima seoskih gazdinstava. Rezultati jasno ukazuju da ekstenzivan način proizvodnje, zbog očigledno niskog nivoa biosigurnosnih mera predstavlja faktor rizika za izloženost virusu Zapadnog Nila, odnosno vektorima.

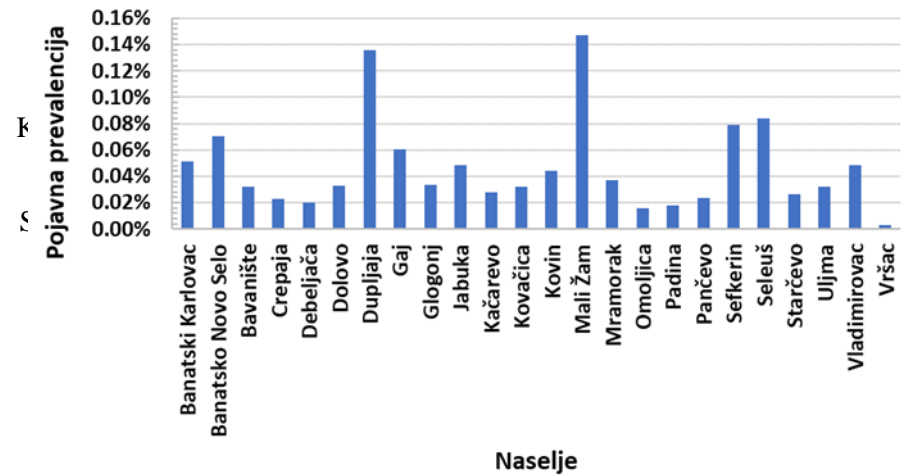
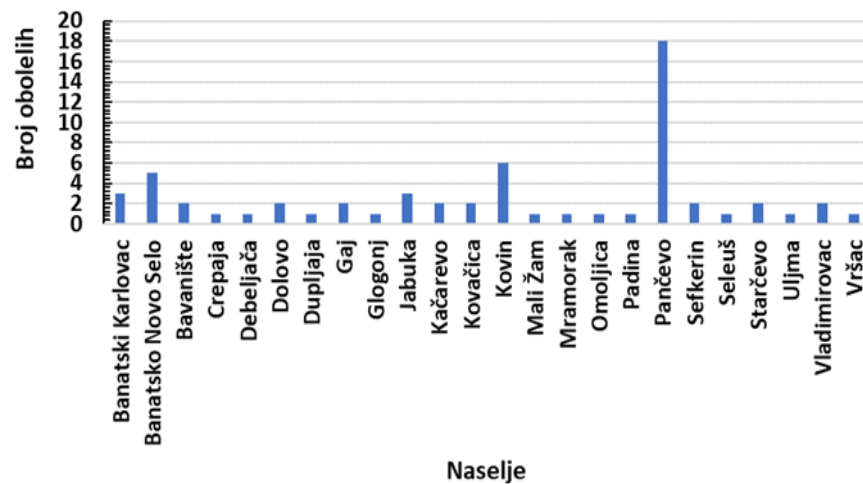
Tabela 25. Odnos prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja gajenih na ekstenzivan i intenzivan način u Južnobanatskom okrugu u 2018. godini

SVINJE _{EXT} : SVINJE _{INT}	GOVEDA _{INT} : SVINJE _{INT}	SVINJE _{EXT} : ŽIVINA _{EXT}
$OP = p(S_{EXT+} S_{EXT})/p(S_{INT+} S_{INT})$	$OP = p(G_{INT+} G_{INT})/p(S_{INT+} S_{INT})$	$OP = p(S_{EXT+} S_{EXT})/p(\check{Z}_{EXT+} \check{Z}_{EXT})$
5,02	5,64	1,04

Legenda: p- prevalencija; EXT- ekstenzivna proizvodnja; INT- intenzivna proizvodnja; S_{EXT+} - seropozitivne svinje u ekstenzivnoj proizvodnji; S_{INT+} - seropozitivne svinje u intenzivnoj proizvodnji; G_{INT+} - seropozitivna goveda u intenzivnoj proizvodnji; Ž_{EXT+} - seropozitivna živina u intenzivnoj proizvodnji

5.7. Deskriptivna analiza epidemioloških indikatora groznice Zapadnog Nila na ispitivanom području

U 2018. godini na širem području Južnobanatskog okruga, registrovana su 63 slučaja infekcije virusom groznice Zapadnog Nila kod ljudi. Najveći broj registrovanih slučajeva zabeležen je u Pančevu, ukupno 18 slučajeva obolelih. Na grafikonu 10 prikazana je distribucija kliničkih slučajeva groznice Zapadnog Nila kao i osnovni epidemiološki indikatori bolesti kod ljudi.



Pod rizikom: 220,170; Ukupno obolelih: 63; Kumulativna incidencija: 0.03%; Stopa incidencije: 1.7/na 1,000,000 stanovnika

Maksimum: 0.15%; Minimum: 0.003%; Prosek: 0.05%; CV: 73.38%

a) Distribucija kliničkih slučajeva infekcije ljudi virusom Zapadnog Nila u 2018. godini

b) Pojavna prevalencija registrovanih slučajeva oboljevanja ljudi

Grafikon 10. Distribucija kliničkih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila i pojavne prevalencije na teritoriji Južnobanatskog okruga u 2018. godini kod ljudi

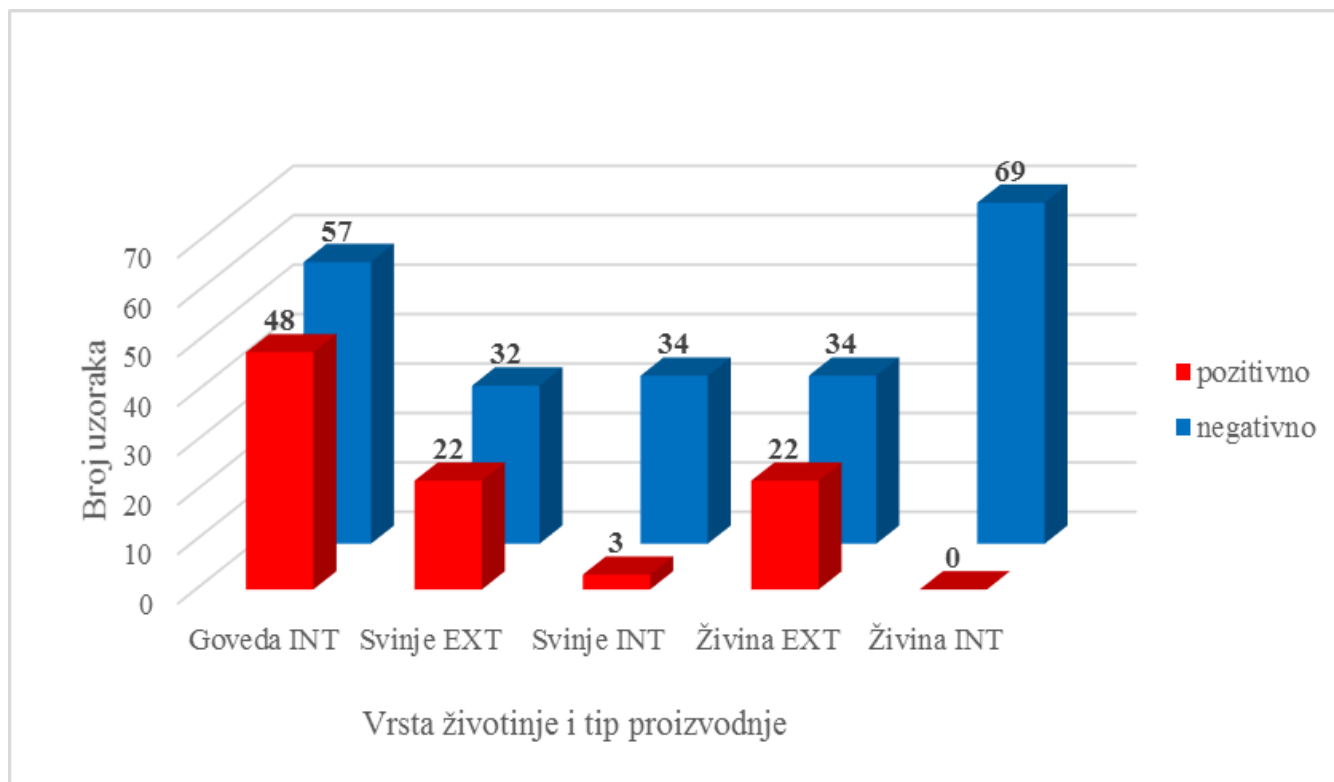
Na Grafikonu 10 prikazana je distribucija kliničkih slučajeva infekcije virusom groznice Zapadnog Nila u 2018. godini. Na teritoriji ovih naseljenih mesta nalazi se ukupno 220 170 stanovnika. U 2018. godini registrovano je 56 obolelih osoba, što daje kumulativnu incidenciju od 0,03%, odnosno 28,64 kliničkih slučajeva na 100 000 stanovnika. U sezoni aktivnog prenošenja virusa i pojavljivanja bolesti (maj-novembar) prosečna stopa incidencije je iznosila 2,48 slučajeva na 100 000 stanovnika mesečno. Na ispitivanom području, u naseljenom mestu Mali Žam u opštini Vršac registrovana je najviša prevalencija od 0,15%, dok je najniža prevalencija od 0,003% zabeležena u naseljenom mestu Vršac. Prosečna prevalencija iznosila je 0,05%, uz koeficijent varijacije (CV) 73,38%.

5.8. Izbor potencijalnih sentinel vrsta - rezultati ekološke studije posmatranja linearne povezanosti faktora izloženosti i broja seropozitivnih životinja na virus Zapadnog Nila

5.8.1. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „vrsta domaće životinje/tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije/serokonverzije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja

U Tabeli 26, dat je uporedni prikaz različitih vrsta domaćih životinja kod kojih je izvršeno uzorkovanje krvi u 2018. godini u formi tabele kontigencije. Uz to, dat je uporedni prikaz dobijenih rezultata laboratorijskih ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod ispitivanih životinja. S obzirom na to da je ispitivan tip proizvodnje kao faktor rizika izloženosti virusu, grupisanje ispitivanih životinja je izvršeno na osnovu dva kriterijuma: životinjska vrsta i tip proizvodnje u kojima se odgajaju životinje. Ovako prikupljeni podaci su analizirani statističkim testovima za ocenu nezavisnosti i testovima za ocenu povezanosti između pretpostavljenog faktora rizika izloženosti virusu i broja registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila.

Na Grafikonu 11, dat je grafički prikaz tabele kontigencije životinjskih vrsta, načina držanja domaćih životinja i broja slučajeva serokonverzije na virus Zapadnog Nila. Na grafikonu se može uočiti značajno veći broj slučajeva infekcije odnosno broja seropozitivnih jedinki kod domaćih životinja držanih u ekstenzivnim uslovima proizvodnje i kod goveda u intenzivnoj proizvodnji.



Legenda: INT- intenzivna proizvodnja; EXT- ekstenzivna proizvodnja

Grafikon 11. Grafički prikaz tabele kontigencije različitih vrsta životinja, tipova proizvodnje i registrovanog broja slučajeva infekcije /serokonverzije na virus Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Tabela 26. Tabela kontigencije različitih životinjskih vrsta držanih u ekstenzivnim i intenzivnim uslovima proizvodnje (faktor rizika izloženosti virusu: tip proizvodnje) u 2018. godini

Vrsta životinje / tip proizvodnje	(+)	(-)	UKUPNO
Goveda INT	48	57	105
Svinje EXT	22	32	54
Svinje INT	3	34	37
Živina EXT	22	34	56
Živina INT	0	69	69
UKUPNO	95	226	321

Legenda:

INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivni način proizvodnje;

(+) – pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila; (-) – negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila

Tabela 27. Rezultati ocene međusobne povezanosti faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila – „tip proizvodnje“ i ukupnog broja seropozitivnih životinja kod različitih životinjskih vrsta (ocena je urađena hi-kvadrat testom, Vilkovim G^2 test i određivanjem koeficijenata kontigencije)

χ^2 – test:	
χ^2	56,0398
χ^2 – kritična vrednost	9,4877
DF- stepeni slobode	4
p-vrednost	< 0,0001
alfa (greška prvog reda)	0,05
Vilkov G^2 test (Wilks test):	
Vilkov G^2 (Wilks test)	76,2962
Vilkov G^2 - kritična vrednost	9,4877
DF – stepeni slobode	4
p-vrednost	< 0,0001
alfa (greška prvog reda)	0,05
Pirsonov koeficijent kontigencije:	0,39
ϕ_c koeficijent:	0,42

U Tabeli 27 prikazani su rezultati ocene statističke značajnosti povezanosti faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila „tip proizvodnje“ i broja registrovanih seropozitivnih slučajeva kod različitih vrsta domaćih životinja. Ocena međusobne povezanosti navedenog faktora rizika i ukupnog broja seropozitivnih životinja urađena je hi-kvadrat testom i Vilkovim G^2 testom (testovi nezavisnosti između redova i kolona tabela kontigencije) kao i određivanjem Pirsonovog koeficijenta kontigencije i ϕ_c koeficijenta (koeficijenti povezanosti-pridruživanja između redova i kolona tabela kontigencije).

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 27 odbačena je nulta hipoteza da tip proizvodnje ne utiče na broj inficiranih životinja i potvrđena alternativna hipoteza da broj inficiranih životinja zavisi od načina proizvodnje. Nivo značajnosti je utvrđen na nivou od 95%.

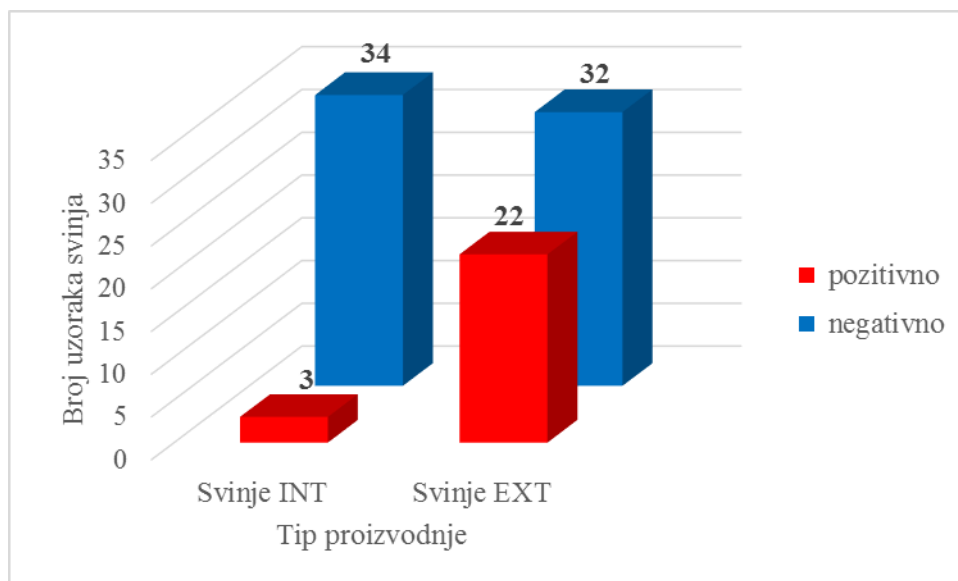
Kako je u određivanju sentinel vrsta od najvećeg značaja kvalitet i pouzdanost upotrebljenih seroloških testova, u tabeli broj 28 date su karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje seruma goveda na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Očekivani broj lažno pozitivnih rezultata iznosio je 2.

Tabela broj 28. Karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje uzorka krvnih seruma goveda na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila

Karakteristike testa	Vrednosti
Se (ELISA INgezim WNV compac)	100,00%
Sp (ELISA INgezim WNV compac)	96,00%
PPV	95,05%
PPN	100,00%
Očekivani broj lažno pozitivnih	2
Očekivani broj lažno negativnih	0
Pojavna prevalencija	45,71%
Stvarna prevalencija	43,45%
Stopa lažno pozitivnih	4,00%
Stopa lažno negativnih	0,00%

5.8.2. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod svinja uzgajanih na farmama i seoskim gazdinstvima

Na Grafikonu 12 dat je grafički prikaz tabele kontigencije ispitanih svinja, tipova proizvodnje i registrovanog broja slučajeva serokonverzije na virus Zapadnog Nila. Kod svinja poreklom sa individualnih gazdinstava, gde je dominantno zastupljena ekstenzivna proizvodnja, usled veće izloženosti komarcima kao vektorima infekcije, može se uočiti veći broj seropozitivnih grla.



Legenda: INT- intenzivna proizvodnja; EXT- ekstenzivna proizvodnja

Grafikon 12. Grafički prikaz tabele kontigencije ispitanih svinja, tipova proizvodnje i registrovanog broja slučajeva infekcije/serokonverzije na virus Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Tabela 29. Tabela kontigencije ispitanih svinja držanih u ekstenzivnim i intenzivnim uslovima proizvodnje (faktor rizika izloženosti virusu: tip proizvodnje) u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu (Pagano i sar, 2000)

Vrsta životinje / tip proizvodnje	(+)	(-)	UKUPNO
Svinje EXT	22	32	54
Svinje INT	3	34	37

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja;

(+) – pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila, (-) – negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila

U Tabeli 29 dat je uporedni prikaz rezultata dobijenih kod svinja nakon uzorkovanja krvi u 2018. godini u formi tabele kontigencije. Uz to, dat je uporedni prikaz dobijenih rezultata laboratorijskih ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod ispitivanih životinja. S obzirom na to da je ispitivan tip proizvodnje kao faktor rizika izloženosti virusu, grupisanje rezultata je izvršeno na osnovu tipa proizvodnje u kojima se odgajaju svinje. Ovako grupisani podaci su analizirani statističkim testovima za ocenu nezavisnosti i testovima za ocenu povezanosti između pretpostavljenog faktora rizika izloženosti virusu i broja registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila.

U Tabeli 30. prikazani su rezultati ocene statističke povezanosti faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila u odnosu na tip proizvodnje i broja registrovanih seropozitivnih svinja. Ocena međusobne povezanosti navedenog faktora rizika i

ukupnog broja seropozitivnih životinja urađena je hi-kvadrat testom i Vilkovim G^2 (testovi nezavisnosti između redova i kolona tabela kontigencije) kao i određivanjem Pirsonovog koeficijenta kontigencije i ϕ_c koeficijenta (koeficijenti povezanosti-pridruživanja između redova i kolona tabela kontigencije).

Tabela 30. Rezultati analize statističke značajnosti razlike pojavnih incidencija - kod svinja gajenih u ekstenzivnim i intenzivnim uslovima držanja u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu (Altman DG 1991; Ronald N. Forthofer i sar., 2007).

χ^2 – test:	
χ^2	11.7343
χ^2 – kritična vrednost	3.8415
DF- stepeni slobode	1
p-vrednost	0.0006
alfa (greška prvog reda)	0.05
χ^2 – test sa Jatesovom korekcijom :	
χ^2	10.1537
χ^2 – kritična vrednost	3.8415
DF- stepeni slobode	1
p-vrednost	0.0014
alfa (greška prvog reda)	0.05
Fišerov test:	
p-vrednost	0.0007
alfa (greška prvog reda)	0.05
Vilkov G^2 test:	
Vilkov G^2	13.1772
Vilkov G^2 - kritična vrednost	3.8415
DF – stepeni slobode	1
p-vrednost	0.0003
alfa (greška prvog reda)	0.05
Pirsonov koeficijent kontigencije:	0.40
ϕ_c koeficijent:	0.44

Kod ove životinjske vrste uočena je visoka statistička značajnost razlika u rezultatima seroprevalencije koja je uslovljena načinom držanja svinja. Kod svinja držanih u ekstenzivnim uslovima, gde su životinje više izložene vektorima virusa Zapadnog Nila serokonverzija se značajno češće detektuje. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 30 odbačena je nulta hipoteza da tip proizvodnje ne utiče na broj inficiranih svinja i potvrđena alternativna hipoteza da broj inficiranih životinja zavisi od načina proizvodnje. Značajnost je utvrđen na nivou od 95%.

U Tabeli 31 prikazani su rezultati ispitivanja odnosa šansi za pojavu specifičnih antitela protiv virusa groznice Zapadnog Nila u krvnom serumu ispitanih svinja u intenzivnoj i ekstenzivnoj proizvodnji. Treba uočiti da svinje u ekstenzivnoj proizvodnji imaju 7,79 puta veće šanse da se inficiraju u odnosu na svinje koje se drže u intenzivnim uslovima proizvodnje.

Tabela 31. Odnos šansi inficiranja svinja virusom Zapadnog Nila držanih u intenzivnim i ekstenzivnim uslovima proizvodnje

OR (odnos šansi)	(+)	(-)
Svinje EXT	22	32
Svinje INT	3	34
OR	7,79	
95% Interval pouzdanosti (DGI, GGI)	2,12	2857
z statistik	3,10	
p- vrednost	< 0,001	
SE (standardna greška)	0,66	

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja;

(+) – pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila, (-) – negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila

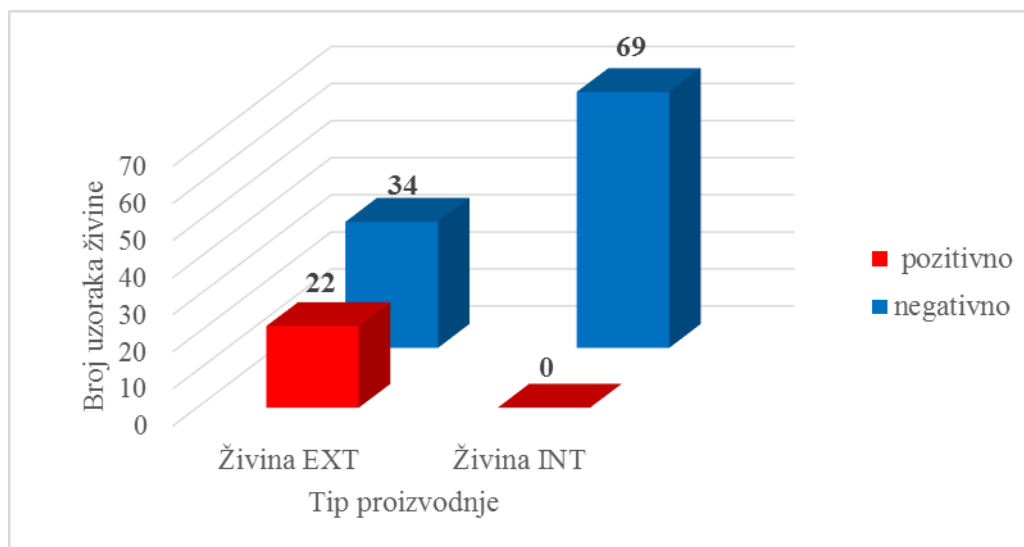
U tabeli 32 prikazane su karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje uzoraka seruma svinja iz koje se vidi da je stopa očekivanih lažno pozitivnih rezultata 4%.

Tabela 32. Karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje uzorka krvnih seruma svinja na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila

Karakteristike testa	Vrednosti
Se (ELISA INgezim WNV compac)	100,00%
Sp (ELISA INgezim WNV compac)	96,00%
PPV	86,27%
PPN	100,00%
Očekivani broj lažno pozitivnih	4
Očekivani broj lažno negativnih	0
Pojavna prevalencija	23,28%
Stvarna prevalencija	20,08%
Stopa lažno pozitivnih	4,00%
Stopa lažno negativnih	0,00%

5.8.3. Ispitivanje povezanosti faktora rizika „tip proizvodnje“ na ukupan broj registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod živine držane na farmama i seoskim gazdinstvima

Na Grafikonu 13 prikazana je tabela kontigencije ispitane živine, tipova proizvodnje i registrovanog broja slučajeva infekcije/serokonverzije izazvanih virusom Zapadnog Nila. Kod živine poreklom sa individualnih gazdinstava, gde je dominantno zastupljena ekstenzivna proizvodnja, može se uočiti veći broj seropozitivnih jedinki.



Legenda: EXT- ekstenzivna proizvodnja; INT: intenzivna proizvodnja

Grafikon 13. Grafički prikaz tabele kontigencije ispitane živine, tipova proizvodnje i registrovanog broja slučajeva infekcije/serokonverzije izazvane virusom Zapadnog Nila u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Tabela 33. Tabela kontigencije ispitane živine držane u ekstenzivnim i intenzivnim uslovima proizvodnje (faktor rizika izloženosti virusu: tip proizvodnje) u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

Vrsta životinje / tip proizvodnje	(+)	(-)	UKUPNO
Živina EXT	22	34	56
Živina INT	0	69	69

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja;
 (+) – pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila, (-) – negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila

U Tabeli 33 dat je uporedni prikaz rezultata dobijenih nakon uzorkovanja krvi živine u 2018. godini u formi tabele kontigencije. Uz to, dat je uporedni prikaz dobijenih rezultata laboratorijskih ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod ispitivanih životinja. S obzirom na to da je ispitivan tip proizvodnje kao faktor rizika izloženosti virusu, grupisanje dobijenih rezultata kod živine je izvršeno na osnovu tipa proizvodnje. Ovako sumirani podaci su analizirani statističkim testovima za ocenu nezavisnosti i testovima za ocenu povezanosti između pretpostavljenog faktora rizika izloženosti virusu i broja registrovanih slučajeva infekcije/serokonverzije.

U Tabeli 34. prikazani su rezultat ocene statističke značajnosti povezanosti faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila u odnosu na tip proizvodnje i broj registrovanih slučajeva infekcije kod živine. Ocena međusobne povezanosti navedenog faktora rizika i ukupnog broja seropozitivnih životinja urađena je hi-kvadrat testom i

Vilkovim G^2 (testovi nezavisnosti između redova i kolona tabela kontigencije) kao i određivanjem Pirsonovog koeficijenta kontigencije i ϕ_c koeficijenta (koeficijenti povezanosti-pridruživanja između redova i kolona tabela kontigencije).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 34. odbačena je nulta hipoteza da tip proizvodnje ne utiče na broj inficirane živine odnosno serokonverziju i potvrđena je alternativna hipoteza da broj inficiranih životinja zavisi od načina proizvodnje. Nivo značajnosti je utvrđen na nivou od 95%. Kod ove životinjske vrste uočena je visoka statistička značajnost razlika u rezultatima seroprevalencije koja je uslovljena načinom držanja živine. Kod živine držane u ekstenzivnim uslovima, infekcija virusom Zapadnog Nila se značajno češće javlja.

Tabela 34. Rezultati ocene međusobne povezanosti faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila u odnosu na tip proizvodnje i ukupni broj seropozitivne živine gajene u ekstenzivnim i intenzivnim uslovima držanja (hi-kvadrat test, Vilkov G^2 test i određivanje koeficijenata kontigencije).

χ^2 – test:	
χ^2	31,8251
χ^2 – kritična vrednost	3,8415
DF- stepeni slobode	1
p-vrednost	< 0,0001
alfa (greška prvog reda)	0,05
χ^2 – test sa Jatesovom korekcijom :	
χ^2	29,2652
χ^2 – kritična vrednost	3,8415
DF- stepeni slobode	1
p-vrednost	< 0,0001
alfa (greška prvog reda)	0,05
Vilkov G^2 test:	
Vilkov G^2	37,7460
Vilkov G^2 - kritična vrednost	3,8415
DF – stepeni slobode	1
p-vrednost	< 0,0001
alfa (greška prvog reda)	0,05
Pirsonov koeficijent kontigencije:	0,45
ϕ_c koeficijent:	0,51

U Tabeli 35. dati su rezultati ispitivanja odnosa šansi inficiranja živine virusom Zapadnog Nila u intenzivnoj i ekstenzivnoj proizvodnji. Treba uočiti da živina u ekstenzivnoj proizvodnji ima 90,65 puta veće šanse da bude inficirana virusom Zapadnog Nila od živine koja se drži u intenzivnim uslovima proizvodnje.

Tabela 35. Odnos šansi inficiranja živine virusom Zapadnog Nila držane u intenzivnim i ekstenzivnim uslovima

OR (odnos šansi) *	(+)	(-)
Živina EXT	22,5	34,50
Živina INT	0,50	69,50
OR	90,65	
95% Interval pouzdanosti (DGI, GGI)	5,34	69,50
z statistik	3,12	
p- vrednost	< 0,002	
SE (standardna greška)	1,44	

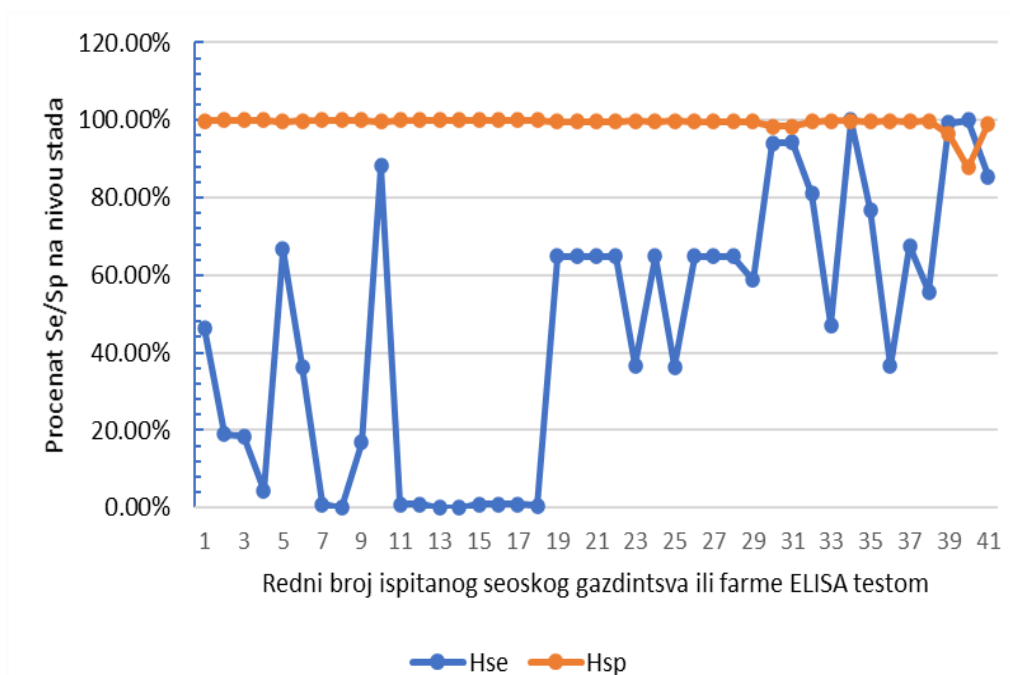
Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivan način proizvodnje;
 (+) – pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila; (-) – negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila

U Tabeli 36. date su karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje uzoraka krvnih seruma živine iz koje je se može videti da je očekivan broj lažno pozitivnih rezultata 1.

Tabela 36. Karakteristike ELISA testa korišćenog za ispitivanje krvnih seruma živine na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila

Karakteristike testa	Vrednosti
Se (ELISA INgezim WNV compac)	100,00%
Sp (ELISA INgezim WNV compac)	98,80%
PPV	94,31%
PPN	100,00%
Očekivani broj lažno pozitivnih	1
Očekivani broj lažno negativnih	0
Pojavna prevalencija	17,60%
Stvarna prevalencija	16,60%
Stopa lažno pozitivnih	1,20%
Stopa lažno negativnih	0,00%

Na Grafikonu 14. prikazane su vrednosti osetljivosti i specifičnosti ELISA testa izračunate na nivou ispitivanih seoskih gazdinstava i farmi. Proračun je urađen pri pretpostavljenoj seroprevalenciji na nivou ispitivanih seoskih gazdinstava i farmi od 20% i pri osetljivosti $Se=100\%$ i specifičnosti $Sp=98.8\%$ ELISA testa (INGEZIM West Nile Compac – Ingenasa, Španija).



Grafikon 14. Osetljivost i specifičnost korišćenog ELISA testa iskazane na nivou ispitivanih seoskih gazdinstava i farmi u 2018. godini u Južnobanatskom okrugu

5.8.4. Rezultati procene faktora rizika izloženosti virusu Zapadnog Nila primenom Bajesove mreže (vrsta, starosta i tip proizvodnje)

Prilikom procene rizika od infekcije virusom Zapadnog Nila, analizirani su faktori za koje se pretpostavlja da povećavaju verovatnoću za nastanak infekcije, a to su: starost, vrsta životinje i tip proizvodnje. U Tabeli 37, prikazana je distribucija verovatnoće pojavljivanja infekcije odnosno serokonverzije kod različitih vrsta domaćih životinja u zavisnosti od njihove starosti. U Tabelama 38, 39 i 40 prikazana je starosna struktura ispitanih životinja, odnos pozitivnih i negativnih životinja ispitanih ELISA testom i struktura uzorka u pogledu načina držanja životinja.

Tabela 37. Distribucija verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila, uslovljene vrstom i starošću životinja

Infekcija	Vrsta/starost u mesecima	Verovatnoća infekcije
NEG	Svinje 6-8	85,53%
POZ	Svinje 6-8	14,47%
NEG	Svinje >8	48,44%
POZ	Svinje >8	51,56%
NEG	Svinje 3-6	46,05%
POZ	Svinje 3-6	53,95%
NEG	Goveda =>24	46,13%
POZ	Goveda =>24	53,87%
NEG	Goveda<12	56,02%
POZ	Goveda<12	43,98%
NEG	Živina 4-6	94,73%
POZ	Živina 4-6	5,27%
NEG	Živina >8	67,75%
POZ	Živina >8	32.25%
NEG	Živina 6-8	82,87%
POZ	Živina 6-8	17,13%

Legenda: NEG- negativan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila; POZ- pozitivan nalaz infekcije virusom Zapadnog Nila;

Verovatnoća infekcije, odnosno rizik od infekcije virusom Zapadnog Nila je iskazana na nivou pojedinačnih stratuma - raspodelu između verovatnoće infekcije (POZ) i verovatnoće da će životinja određene vrste i starosti ostati neinficirana (NEG).

U Tabeli 37 prikazane su distribucije verovatnoća infekcije/serokonverzije groznice Zapadnog Nila, uslovljene vrstom i starošću životinja. Verovatnoća infekcije, odnosno rizik od infekcije virusom Zapadnog Nila iskazane su na nivou pojedinačnih stratuma - raspodelu između verovatnoće infekcije (POZ) i verovatnoće da će životinja određene vrste i starosti ostati neinficirana (NEG). Iz tabele se može uočiti da su svinje starosti 3-6 meseci u najvećem riziku od infekcije virusom Zapadnog Nila (53.9% posmatrano na nivou stratuma), zatim goveda starija od 24 meseca (53.87% posmatrano na nivou stratuma) i živina starosti preko 8 meseci (32.25% posmatrano na nivou stratuma).

Tabela 38. Starosna struktura uzorka svih vrsta domaćih životinja obuhvaćenih istraživanjem

Vrsta i starost ispitanih životinja	Procenatualni udeo u ukupnom uzorku
Svinje 6-8 m	20,87%
Svinje >8 m	3,43%
Svinje 3-6 m	4,05%
Goveda =>24 m	10,59%
Goveda<12 m	22,12%
Živina 4-6 m	24,30%
Živina >8 m	8,72%
Živina 6-8 m	3,12%
Živina <4 m	2,80%

Tabela 39. Struktura uzorka svih vrsta domaćih životinja obuhvaćenih istraživanjem u pogledu načina držanja i odgoja

Tip proizvodnje	Procenat
INT	65,70%
EXT	34,30%

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja;

Tabela 40. Relativan odnos između broja pozitivnih i negativnih slučajeva infekcije na nivou celokupnog ispitanog uzorka (sve životinje obuhvaćene istraživanjem)

Infekcija	Procenat
NEG	72,50%
POZ	27,50%

U Tabeli 41. data je uslovna verovatnoća za nastanak infekcije/serokonverzije protiv virusa Zapadnog Nila kod svinja u zavisnosti od uzrasta i načina držanja. Svinje u ekstenzivnim uslovima držanja imaju znatno veću verovatnoću kontakta sa vektorima virusa u odnosu na svinje koje se drže u intenzivnim uslovima proizvodnje.

Tabela 41. Uslovna verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila kod svinja u zavisnosti od uzrasta i načina držanja svinja p (Serokonverzija/Tip proizvodnje/Starost)

Serokonverzija	Vrsta / starost	Tip pr	Verovatnoća
NEG	Svinje 6-8	INT	30,81%
POZ	Svinje 6-8	INT	2,72%
NEG	Svinje 6-8	EXT	35,90%
POZ	Svinje 6-8	EXT	13,05%
NEG	Svinje >8	EXT	3,65%
POZ	Svinje >8	EXT	4,38%
NEG	Svinje 3-6	EXT	3,65%
POZ	Svinje 3-6	EXT	5,84%

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna način proizvodnje; NEG- negativan nalaz; POZ- pozitivan nalaz;

Tabela 42. Relativan odnos između broja pozitivnih i negativnih slučajeva infekcije svinja virusom Zapadnog Nila na nivou celokupnog ispitanog uzorka (grupno sve životinje obuhvaćene istraživanjem i stratifikovane prema tipu proizvodnje)

Infekcija	Tip proizvodnje	Verovatnoća
NEG	INT	80,84%
POZ	INT	19,16%
NEG	EXT	64,98%
POZ	EXT	35,02%

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja; NEG- negativan nalaz; POZ-pozitivan nalaz

U Tabeli 43. data je uslovna verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila kod živine u zavisnosti od uzrasta i načina držanja. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da živina u ekstenzivnim uslovima držanja ima znatno veću verovatnoću da se inficira virusom Zapadnog Nila u odnosu na živinu koja se drži u intenzivnim uslovima proizvodnje i to posebno u starosti od 4 do 6 meseci i preko 8 meseci.

U Tabeli 44 prikazan je odnos pozitivnih i negativnih životinja ispitanih ELISA testom i struktura uzorka u pogledu načina držanja živine. Kod ekstenzivno gajene živine je utvrđeno čak 38,8% pozitivnih uzoraka krvnih seruma na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Kod živine koja se gaji u intenzivnoj proizvodnji, nisu ustanovljeni serološki pozitivni slučajevi što se može objasniti primenom biosigurnosnih mera na farmama i neuporedivo većoj izloženosti živine u ekstenzivnom odgoju komarcima, vektorima virusa Zapadnog Nila.

Tabela 43. Uslovna verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila kod živine u zavisnosti od uzrasta i načina držanja živine kod živine p (infekcija/Tip proizvodnje/Starost)

Infekcija	Živina / starost	Tip_proizvodnje	Verovatnoća
NEG	Živina 4-6	INT	36,96%
POZ	Živina 4-6	INT	0,00%
NEG	Živina >8	INT	13,27%
POZ	Živina >8	INT	0,00%
NEG	Živina 6-8	INT	4,74%
POZ	Živina 6-8	INT	0,00%
NEG	Živina <4	INT	4,26%
POZ	Živina <4	INT	0,00%
NEG	Živina 4-6	EXT	25,38%
POZ	Živina 4-6	EXT	4,62%
NEG	Živina >8	EXT	0,63%
POZ	Živina >8	EXT	10,14%

Legenda: INT – intenzivna proizvodnja; EXT – ekstenzivna proizvodnja

Tabela 44. Relativan odnos između broja pozitivnih i negativnih slučajeva infekcije živine na nivou celokupnog ispitanog uzorka (grupno sve životinje obuhvaćene istraživanjem i stratifikovane prema tipu proizvodnje)

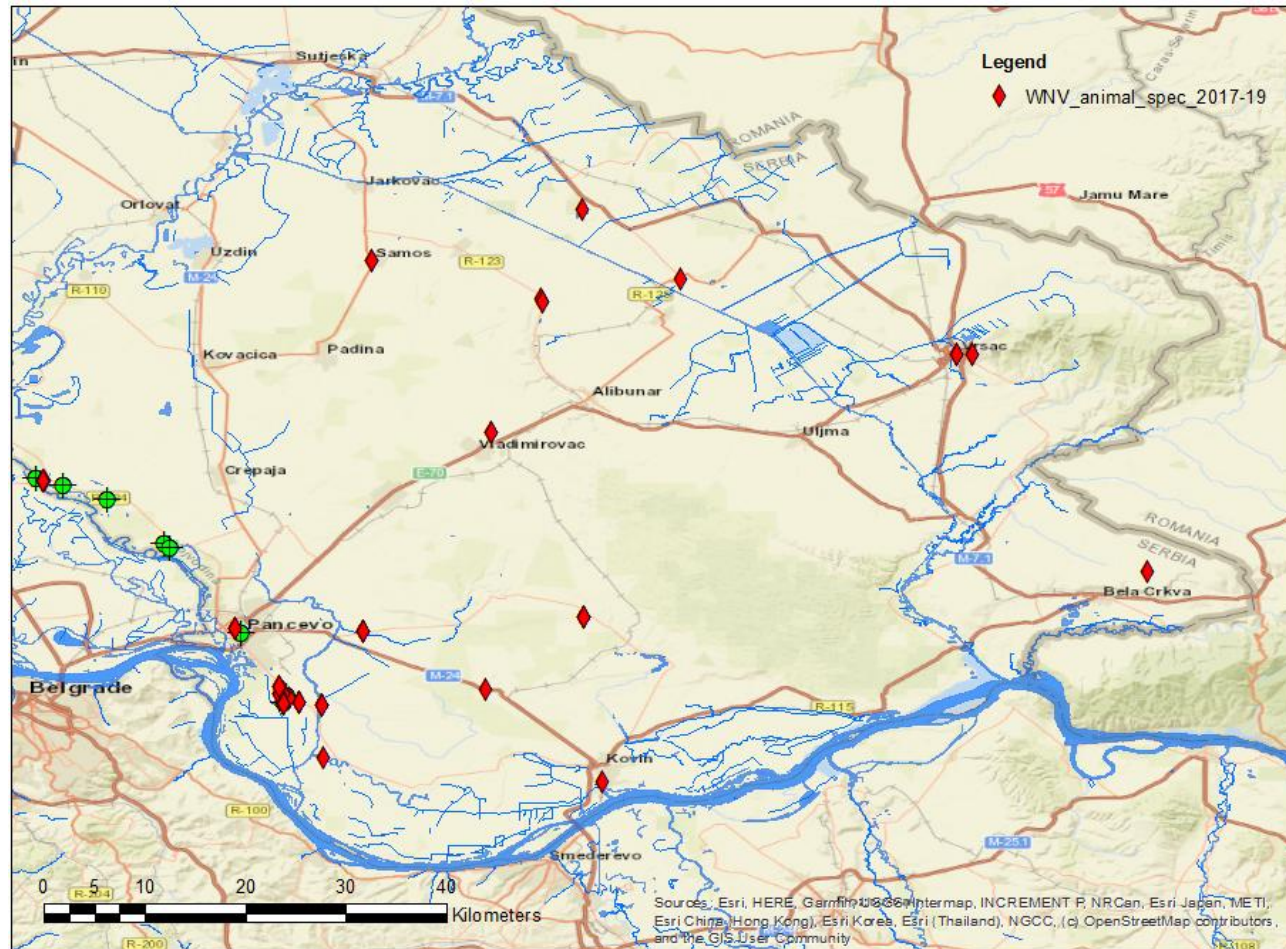
Infekcija	Tip proizvodnje	Verovatnoća
NEG	INT	100,00%
POZ	INT	0,00%
NEG	EXT	61,72%
POZ	EXT	38,28%

5.9. Rezultat geoprostorne analize grupisanja klastera

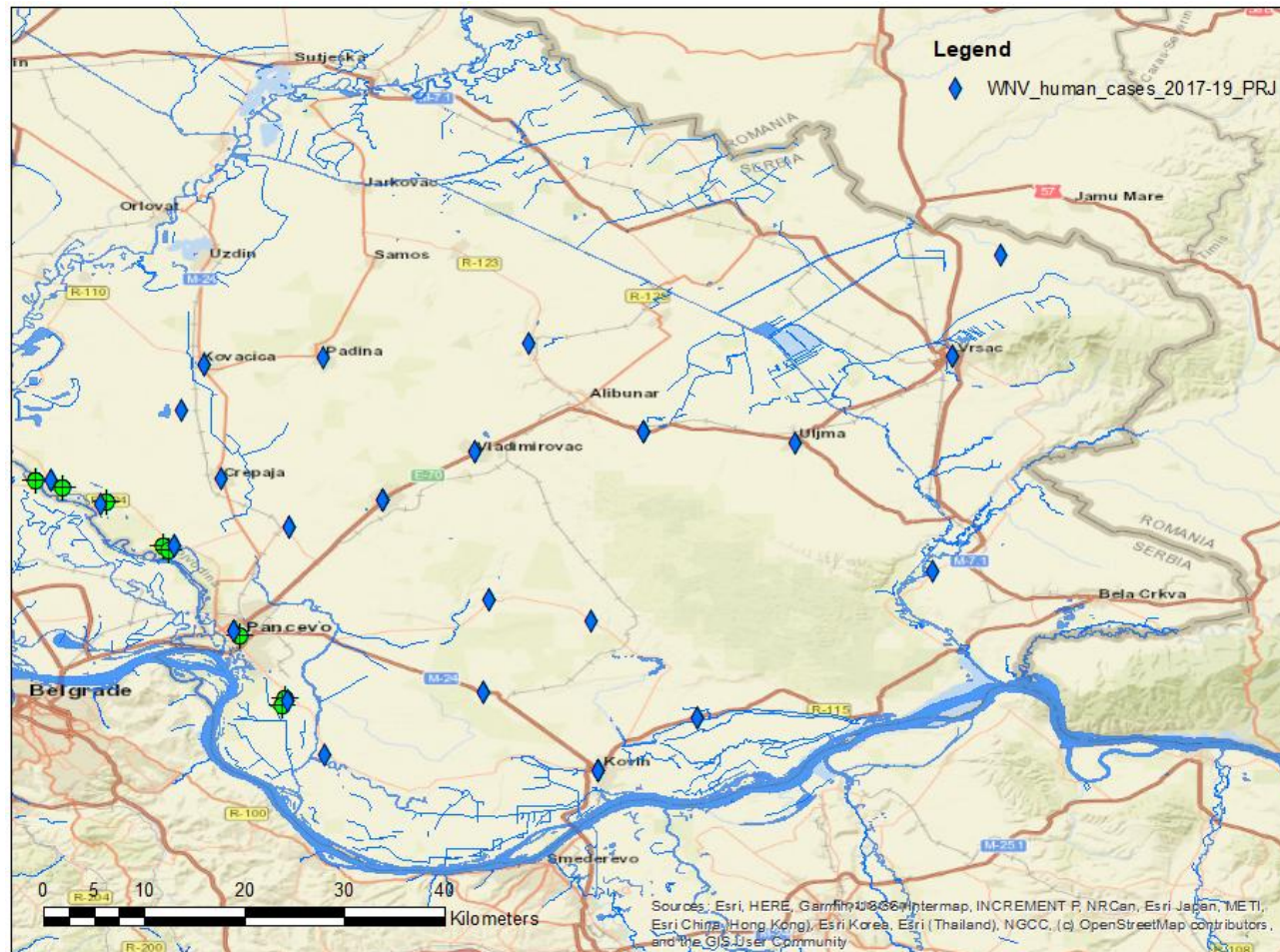
5.9.1. Kartografski prikaz distribucije frekvencija slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila

Na Kartogramu 1 prikazana je distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih vrsta domaćih životinja i ljudi na ispitivanom području Južnobanatskog upravnog okruga. Na kartogramu se uočava grupisanje

slučajeva infekcije kod životinja (crvena boja) i ljudi (plava boja). Zelenom bojom na kartogramu su označene lokacije gde su utvrđeni komaraci pozitivni na virus Zapadnog Nila.

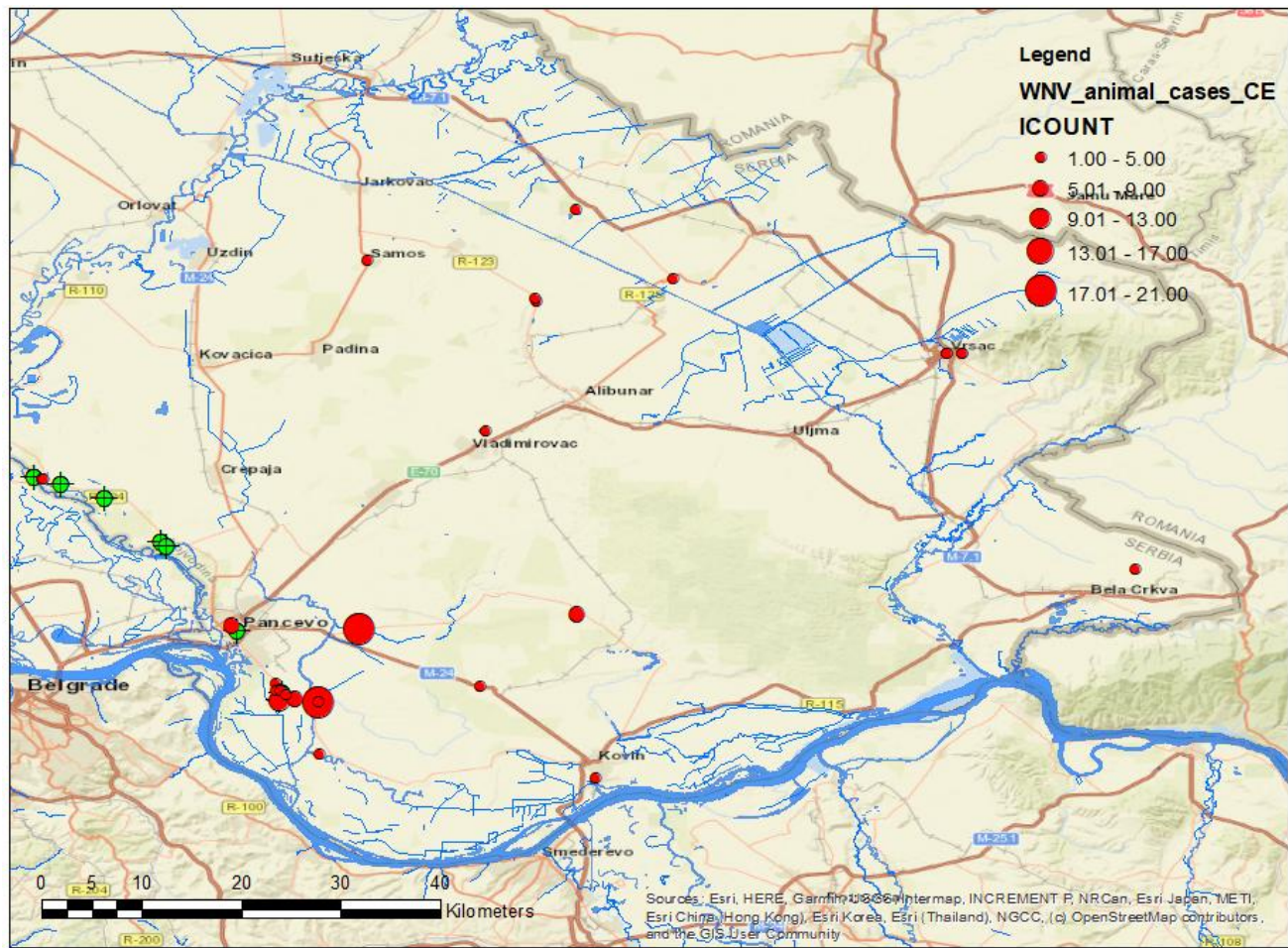


Kartogram 1.(a) Distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom groznice Zapadnog Nila: Distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod životinja

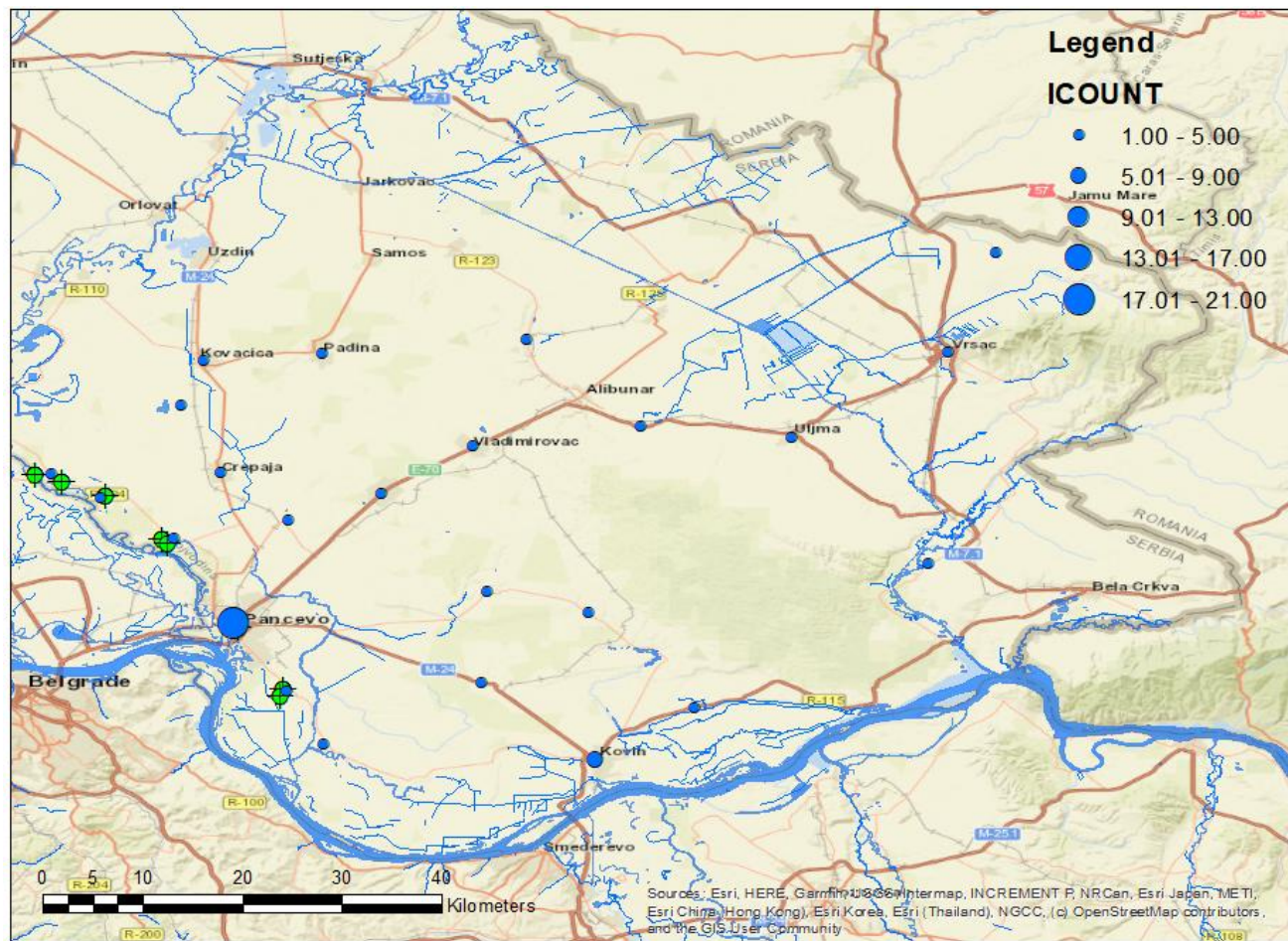


Kartogram 1.(b) Distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom groznice Zapadnog Nila: Distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod ljudi

Na Kartogramu 2, prikazana je distribucija frekvencije slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod domaćih životinja različitih vrsta i kod ljudi na ispitivanom području Južnobanatskog okruga. Registrovani slučajevi na karti su prikazani kružnim simbolima čija veličina zavisi od broja registrovanih slučajeva na lokaciji (kružnice označene crvenom bojom označavaju frekvenciju registrovanih slučajeva kod svih ispitivanih vrsta, uključujući i humanu populaciju, dok su plavom bojom na panelu b) kartograma 1 označeni humani slučajevi infekcije).



Kartogram 2. (a) Distribucija frekvencija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod životinja;

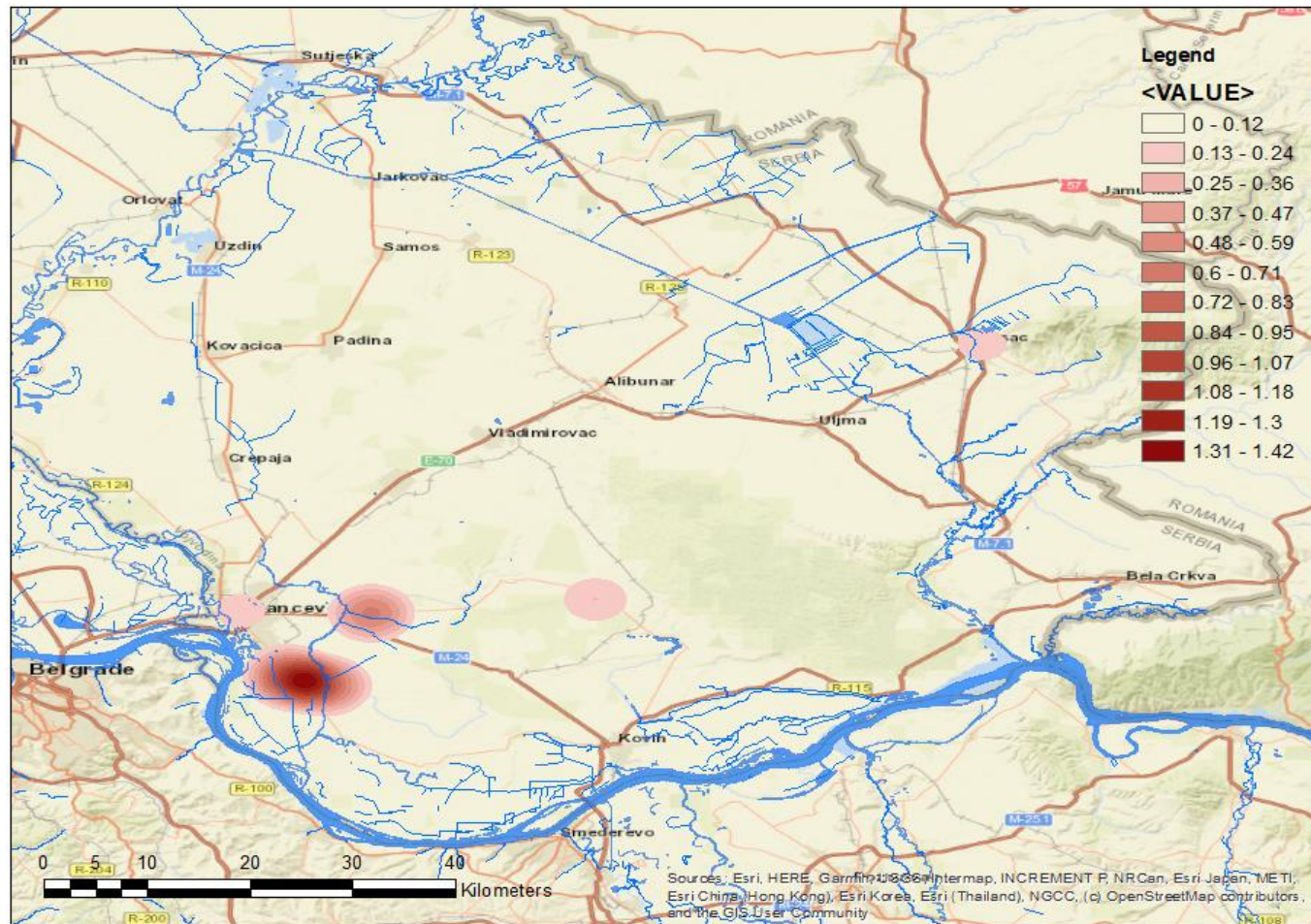


Kartogram 2. (b) Distribucija frekvencija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod ljudi

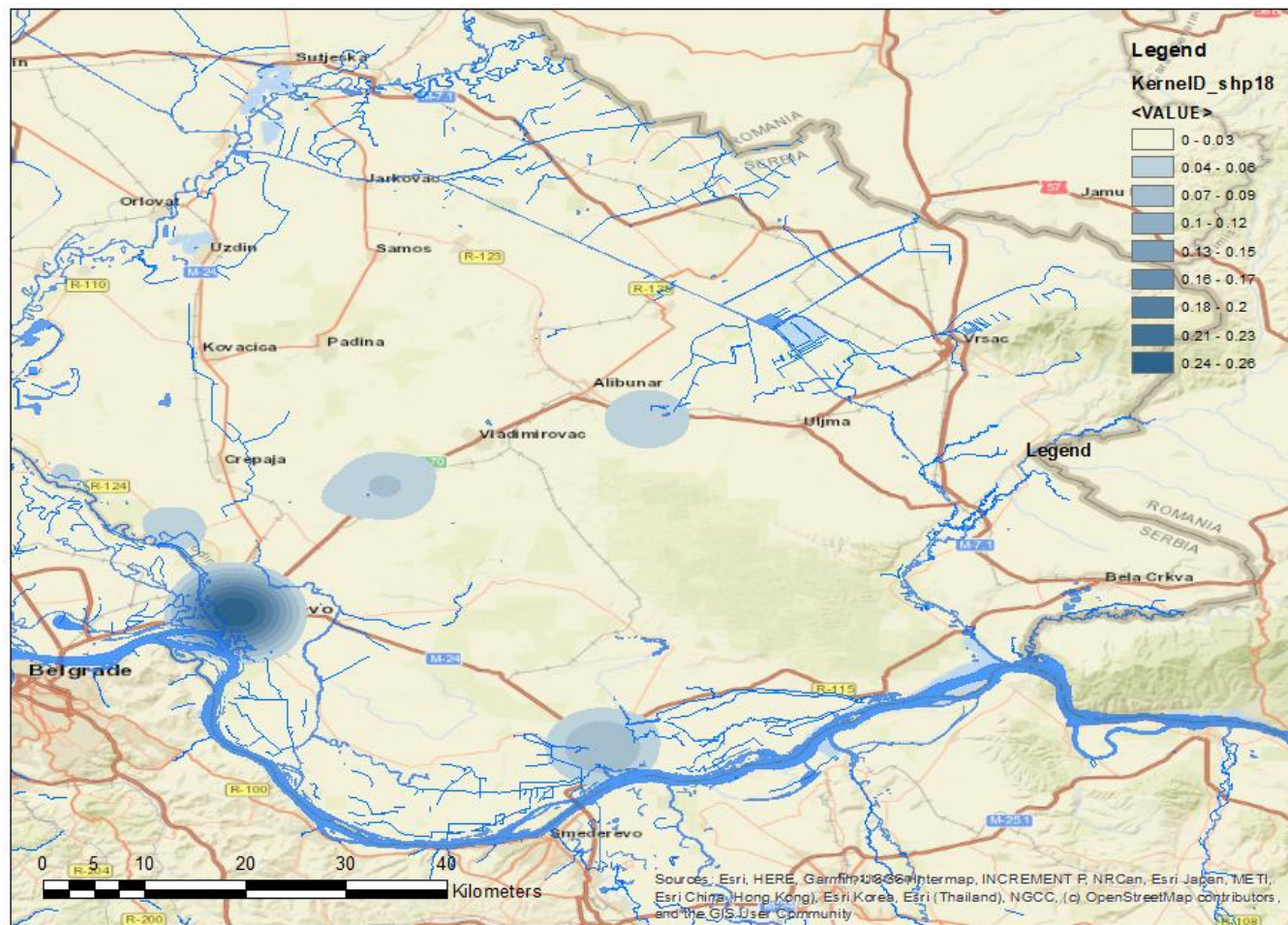
5.9.2. Analiza gustine klastera

Na Kartogramu 3 prikazani su rezultati analize gustine klastera slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila. Gustina klastera urađena je metodom ocene gustine raspodele uz pomoć tzv. funkcije-jezgra (*kernel density estimator*-KDE).

Na Kartogramu 3 se može uočiti da intenzitet gustine klastera, predstavljen crvenom bojom, opada sa udaljavanjem od centra u kome je registrovan najveći broj seropozitivnih životinja. Gustina klastera ljudi obolelih od groznice Zapadnog Nila je prikazana plavom bojom.



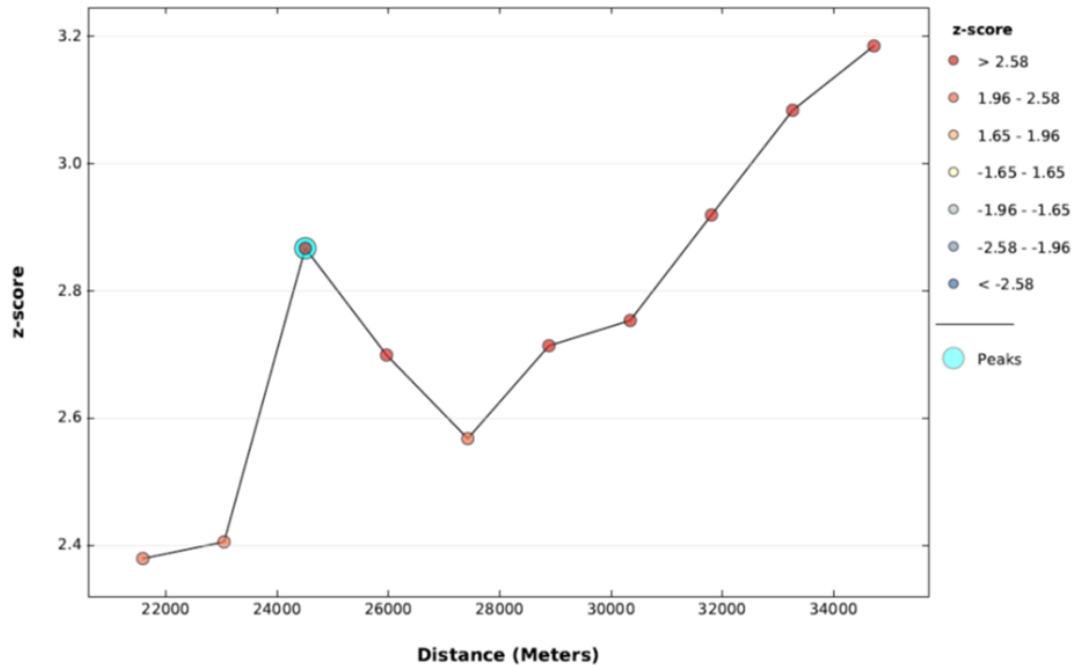
Kartogram 3. (a) Prikaz gustine klastera: KDE slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod životinja



Kartogam 3. (b) Prikaz gustine klastera: KDE slučajevi infekcije virusom Zapadnog Nila kod ljudi

5.9.3. Hot spot analiza klastera

Na Grafikonu 15, dati su rezultati Moranovog I testa (Inkrementalna prostorna autokorelacija). Rezultati testa ukazuju da se statistički značajno grupisanje klastera dešava u prečniku od 24,5 km, stoga je rađena hot spot analiza (p=0,004141).



Grafikon 15. Grafički prikaz rezultat Moranovog I testa

Tabela 45. Tabelarni prikaz Moranovog I testa

Global Moran's I Summary by Distance

Distance	Moran's Index	Expected Index	Variance	z-score	p-value
21584.00	0.188994	-0.020000	0.007717	2.379155	0.017352
23044.01	0.172981	-0.020000	0.006437	2.405322	0.016158
24504.03	0.195584	-0.020000	0.005654	2.867178	0.004141
25964.04	0.176360	-0.020000	0.005292	2.699270	0.006949
27424.06	0.162497	-0.020000	0.005051	2.567905	0.010232
28884.07	0.161083	-0.020000	0.004452	2.713911	0.006649
30344.09	0.158233	-0.020000	0.004190	2.753616	0.005894
31804.10	0.152562	-0.020000	0.003494	2.919548	0.003505
33264.12	0.149981	-0.020000	0.003037	3.084264	0.002041
34724.13	0.148428	-0.020000	0.002796	3.185379	0.001446

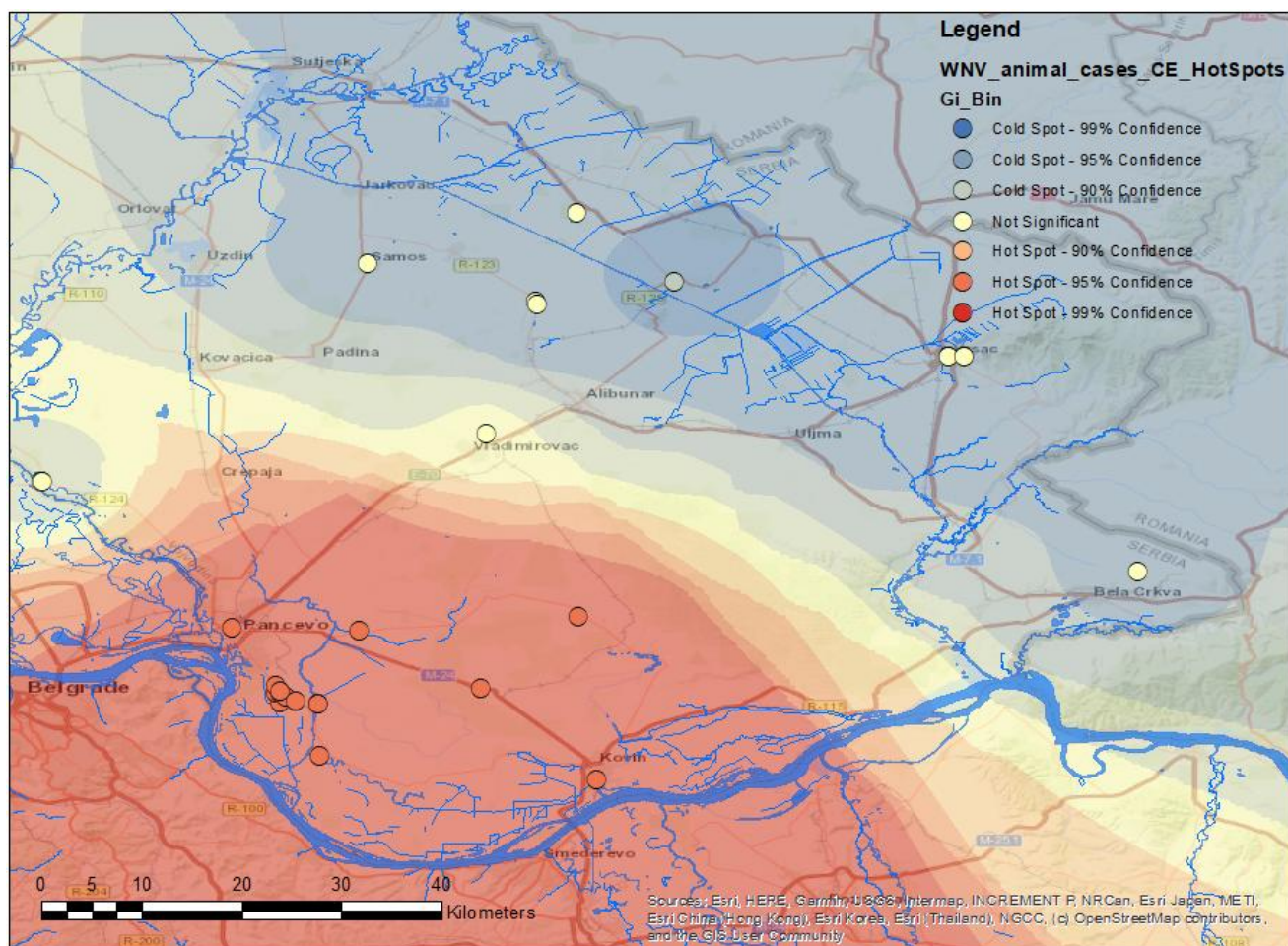
First Peak (Distance, Value): 24504.03, 2.867178

Max Peak (Distance, Value): 24504.03, 2.867178

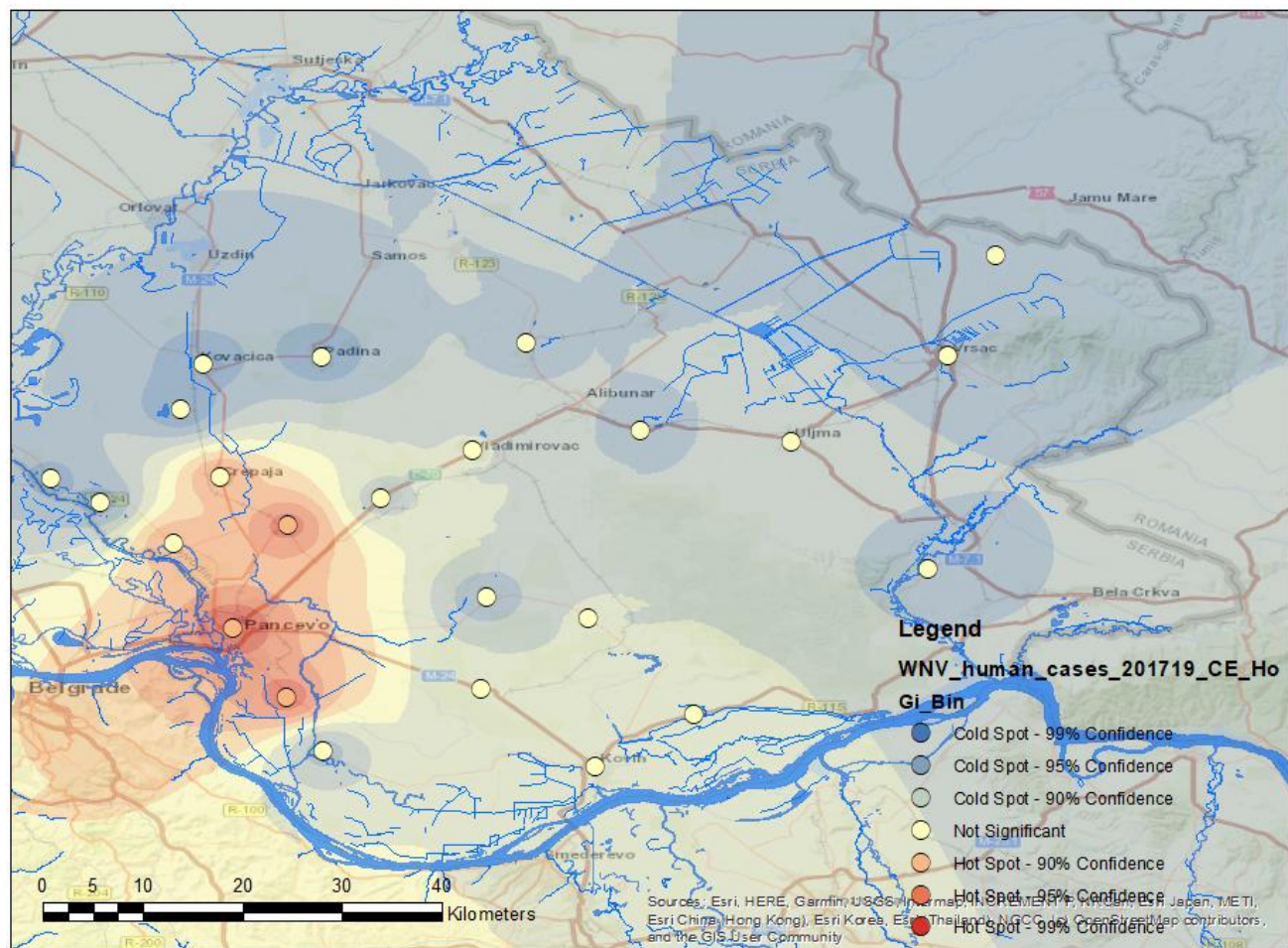
Distance measured in Meters

Na Kartogramu 4. grafički su prikazani rezultati hot spot analize slučajeva infekcije virusom zapadnog Nila kod različitih vrsta životinja i ljudi. Na panelu a) i b) kartograma 4. uočljiv je skoro identičan raspored „vrućih“ tačaka na kojima se grupišu klasteri i kod ljudi i kod životinja, što nedvosmisleno ukazuje na postojanje istog faktora rizika koji dovodi do formiranja i grupisanja klastera. Takođe, na mestu formiranja „vrućih“ tačaka na mapi je uočljiva i razgranata mreža kanala i reka, što svakako predstavlja idealno stanište za komarce i ptice, pa je u tom smislu moguće postojanje uzročne veze.

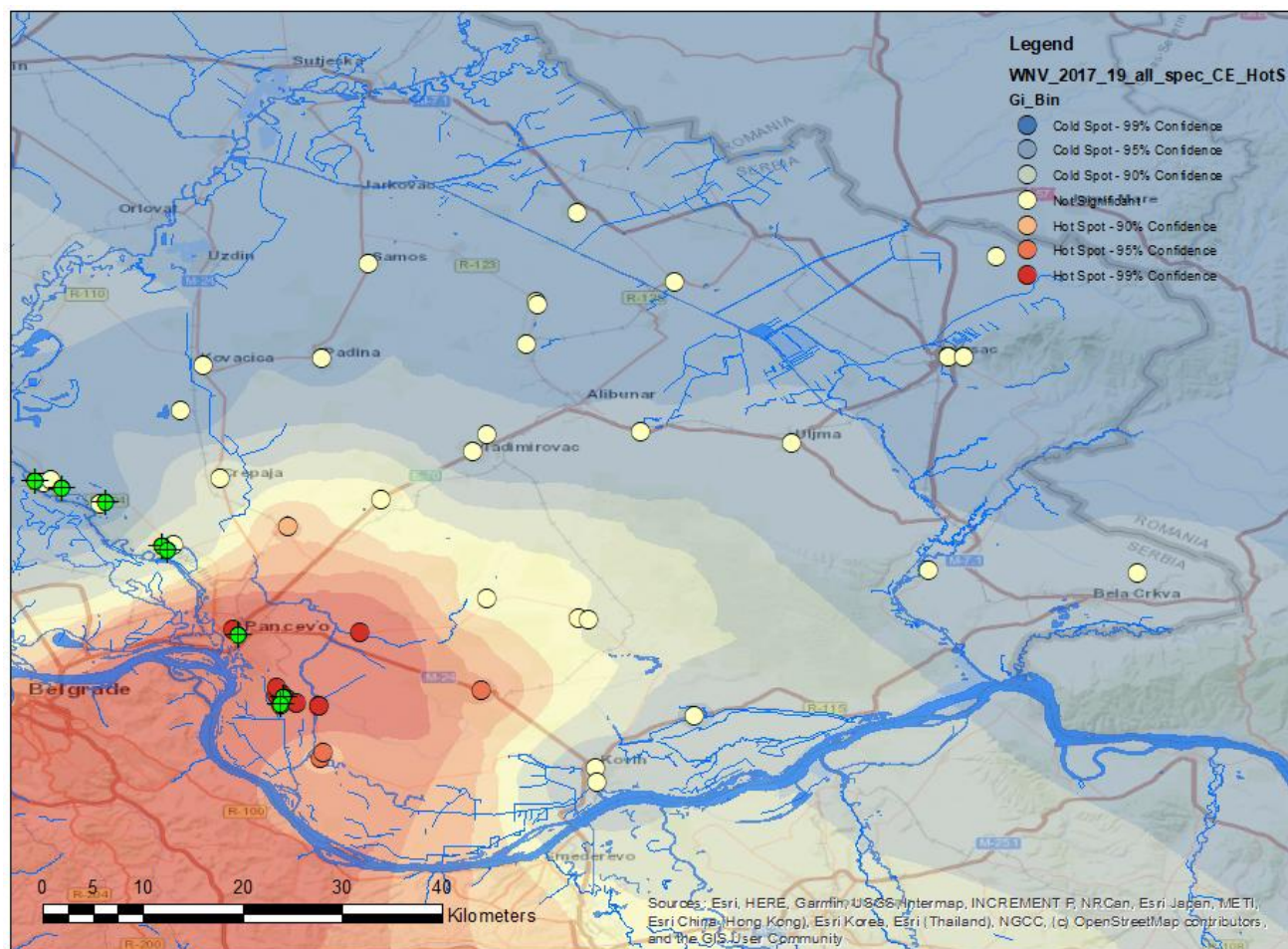
Na Kartogramu 4, paneli a) i b), crvene, narandžaste i svetlo narandžaste tačke predstavljaju klasterne koji su identifikovani kao „vruće“ tačke, odnosno čine grupu klastera kod kojih grupisanje nije rezultat slučajnog događaja već nastaju kao rezultat delovanja ekoloških faktora rizika. Nivo statističke značajnosti grupisanja klastera gradiran je u intervalu od 90-99%. Žute tačke predstavljaju klasterne čije je grupisanje rezultat slučajnog događaja i nisu međusobno povezani.



Kartogram 4. (a) Prostorna hot spot analiza formiranja „vrućih“ i „hladnih“ klastera slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila u 2018. i 2019. godini: Hot spot analiza slučajeva infekcije / serokonverzije virusom Zapadnog Nila kod životinja



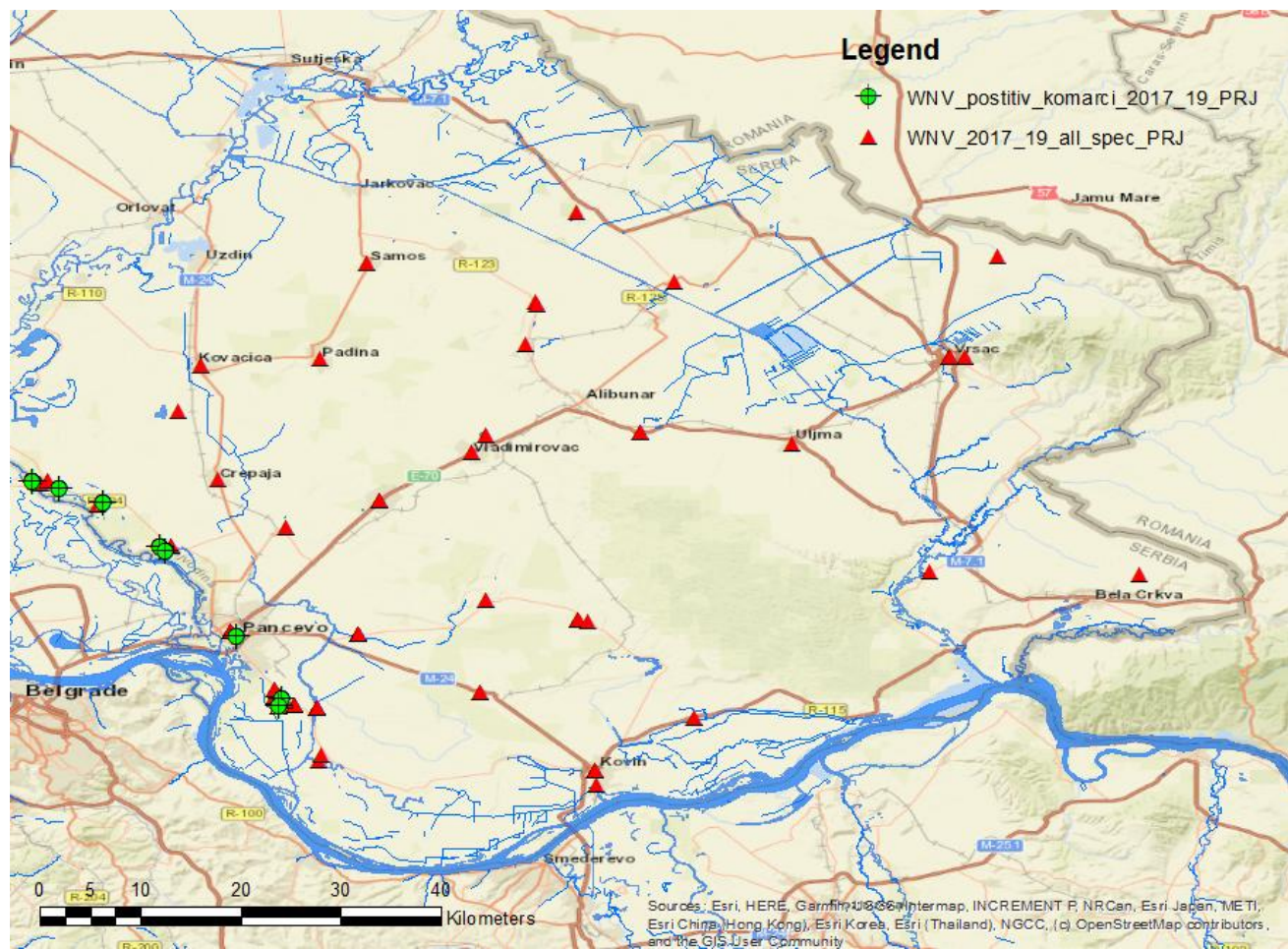
Kartogram 4. (b) Prostorna hot spot analiza formiranja „vrućih“ i „hladnih“ klastera slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila u 2018. i 2019. godini: Hot spot analiza slučajeva groznice Zapadnog Nila kod ljudi



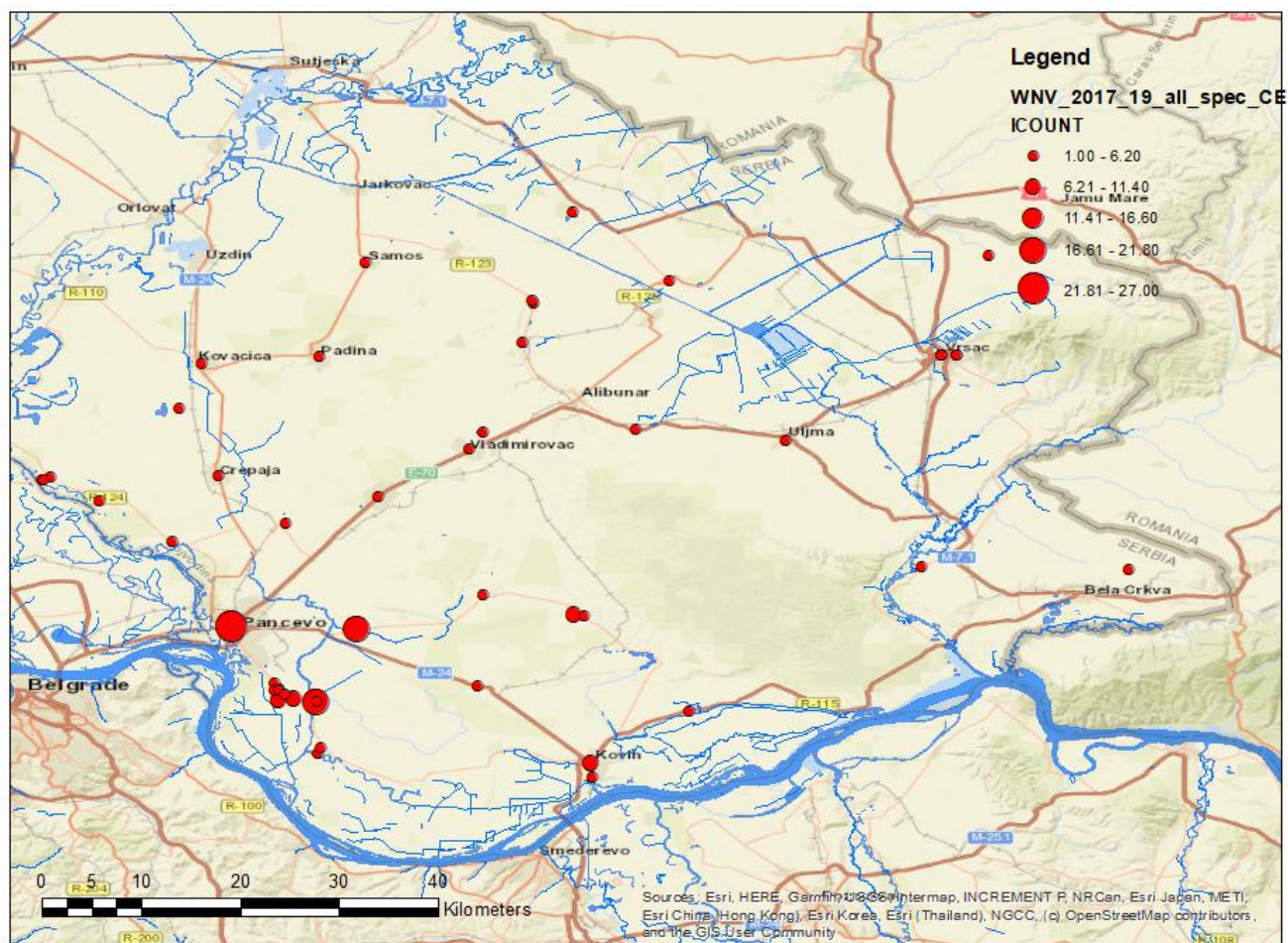
Kartogram 5. Objedinjena prostorna hot spot analiza formiranja „vrućih“ i „hladnih“ klastera slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod životinja i ljudi u 2017. i 2018. godini

Na Kartogramu 5. grafički su prikazani rezultati objedinjene hot spot analize slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih životinja i ljudi. Na mestu formiranja „vrućih“ tačaka na mapi je uočljiva razgranata mreža kanala i reka, što svakako predstavlja idealno stanište za komarce i ptice, pa je u tom smislu moguće postojanje uzročne veze.

Kao i na Kartogramu 4 boje i njihov intenzitet ukazuju na mesta formiranja žarišta odnosno grupe klastera koje nisu posledica slučajnog događanja već posledica delovanja faktora rizika. Nivo statističke značajnosti grupisanja klastera gradiran je u intervalu od 90-99%. Žute tačke predstavljaju klustere čije je grupisanje rezultat slučajnog događaja i nisu međusobno povezani.

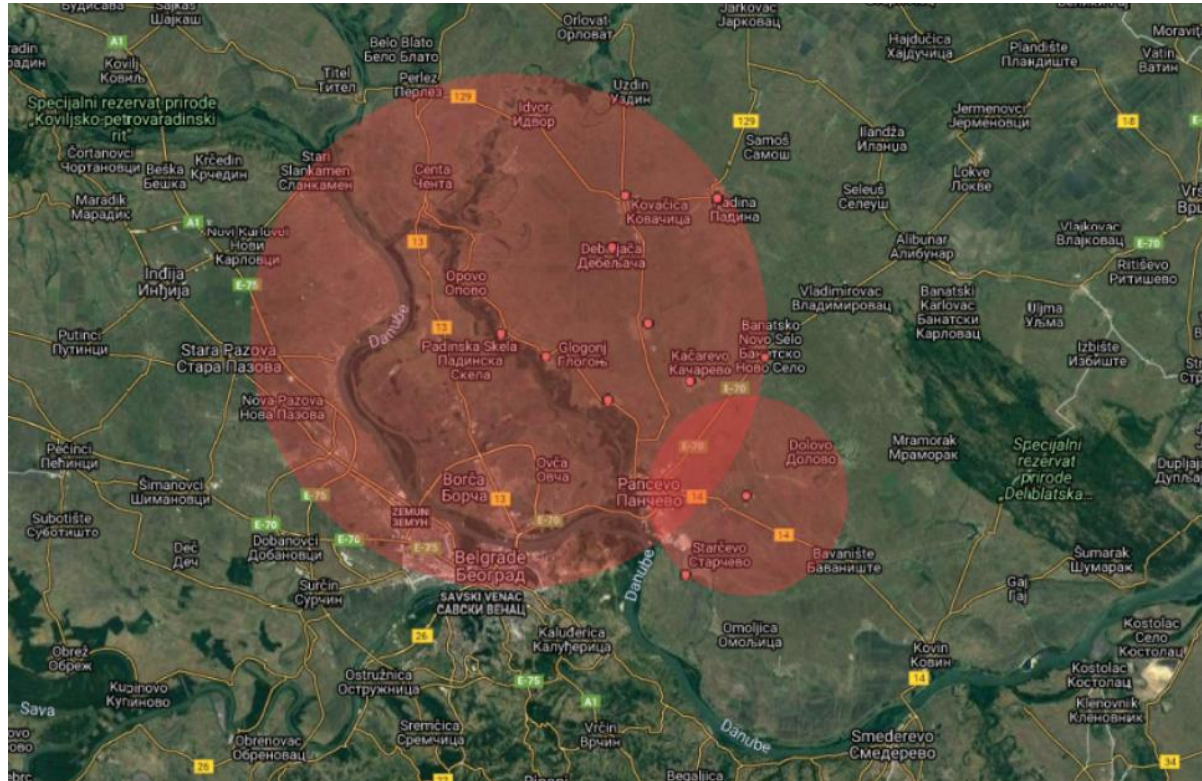


Kartogram 6. (a) Zbirni prikaz svih registrovanih slučajeva infekcije virusom zapadnog Nila kod ljudi i svih životinjskih vrsta kod kojih je ustanovljena serokonverzija na teritoriji Južnobanatskog okruga: prostorna distribucija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod svih prijemčivih vrsta u 2017 i 2018. godini



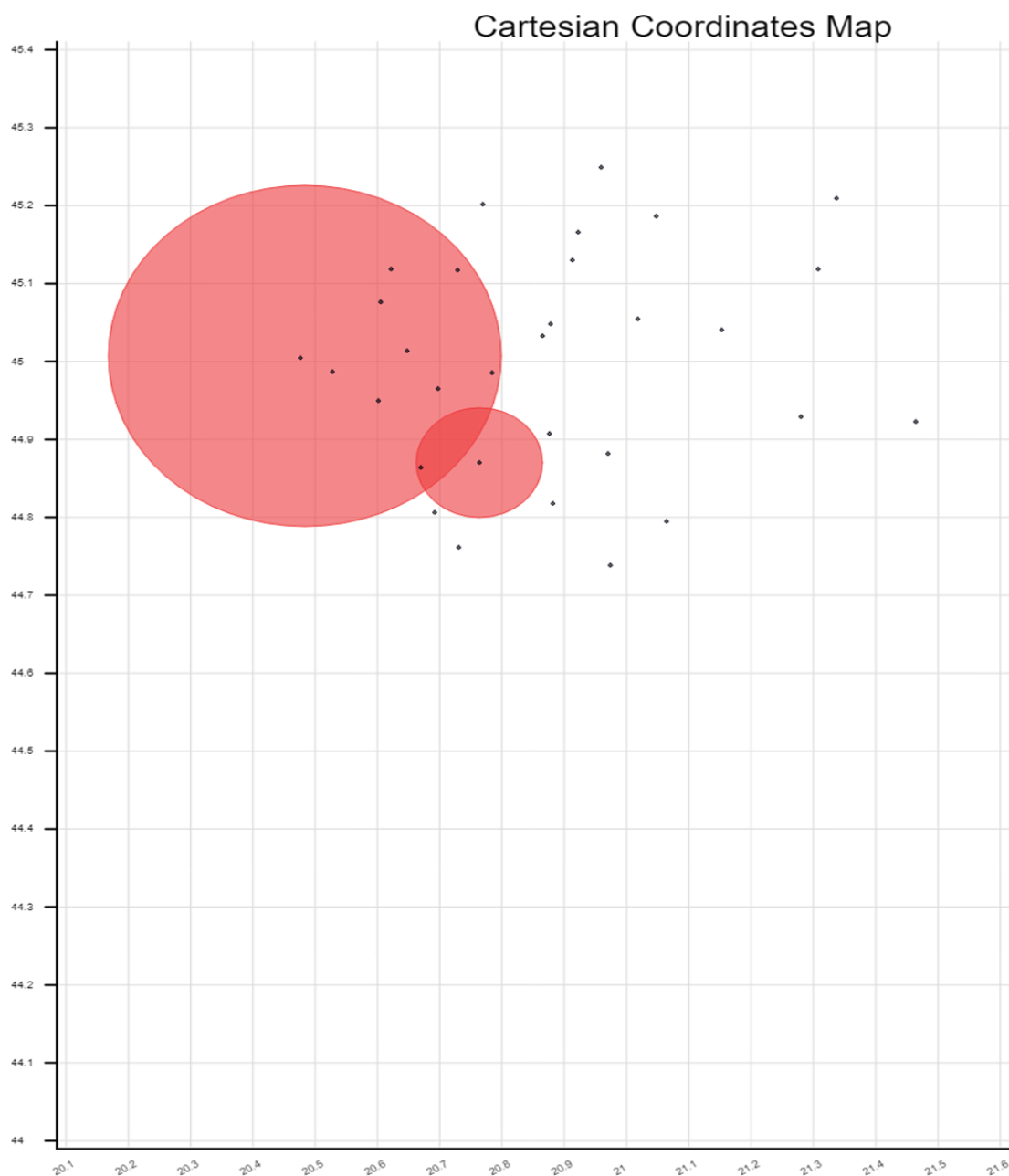
Kartogram 6. (b) Zbirni prikaz svih registrovanih slučajeva infekcije virusom zapadnog Nila kod ljudi i svih životinjskih vrsta kod kojih je ustanovljena serokonverzija na teritoriji Južnobanatskog okruga: distribucija frekvencija registrovanih slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod svih prijemčivih vrsta u 2017 i 2018. godini.

Na Kartogramu 7 dat je kartografski prikaz rezultata prostorne analize slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih životinjskih vrsta i ljudi, urađene uz pomoć Kuldorfove statistike skeniranja. Na kartogramu su prikazani locirani prostorni klasteri, predstavljeni crvenim tačkama koje su okružene crvenim kružnicama. Manji krug predstavlja primarni klaster i obuhvata registrovane slučajeve infekcije u naseljenom mestu Starčevo i na farmi Stari Tamiš. Ovaj klaster je identifikovan kao statistički značajan klaster, dok je većom kružnicom predstavljen sekundarni klaster. Na kartogramu 8, dat je prikaz istih klastera prikazanih u Kartezijevom koordinatnom sistemu.



Legenda: 1) Značajan klaster: Starčevo, Stari Tamiš; 2) Sekundarni klaster: Banatsko Novo Selo, Crepaja, Debeljača, Glogonj, Jabuka, Kačarevo, Kovačica, Padina, Sefkerin

Kartogram 7. Kartografski prikaz rezultata Kuldorfove statistike skeniranja – prostorna analiza slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih životinjskih vrsta i ljudi. Na kartogramu su prikazani detektovani prostorni klasteri. Manja kružnica na mapi predstavlja značajni klaster koji obuhvata slučajeve infekcije u naseljenom mestu Starčevo i na farmi goveda Stari Tamiš. Veća kružnica na mapi predstavlja sekundarni klaster koji obuhvata slučajeve infekcije u naseljima Banatsko Novo Selo, Crepaja, Debeljača, Glogonj, Jabuka, Kačarevo, Kovačica, Padina, Sefkerin.



Kartogram 8. Kartografski prikaz rezultata Kuldorfove statistike skeniranja - specijalna analiza slučajeva infekcije virusa Zapadnog Nila kod različitih životinjskih vrsta i ljudi prikazanih u Kartezijevom koordinatnom sistemu. Na kartogramu su prikazani detektovani prostorni klasteri. Manja kružnica na mapi predstavlja značajni klaster koji obuhvata slučajeve infekcije u naseljenom mestu Starčevo i na farmi goveda Stari Tamiš. Veća kružnica na mapi predstavlja sekundarni klaster koji obuhvata slučajeve infekcije u naseljima Banatsko Novo Selo, Crepaja, Debeljača, Glogonj, Jabuka, Kačarevo, Kovačica, Padina, Sefkerin. Na X i Y osama Kartezijevog koordinatnog sistema označene su geografske koordinate severne geografske širine i istočne geografske dužina Južnobanatskog okruga.

U Tabelama 46-48 prikazani su rezultati Kuldorfove statistike skeniranja slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod ljudi i životinja u periodu 2018-2019. godine. U

tabelama su prikazani detektovani klasteri, kao i njihove karakteristike: broj naseljenih mesta obuhvaćenih klasterom, veličina klastera izražena u km, broj registrovanih slučajeva infekcije, populacija pod rizikom, odnos registrovanih i očekivanih slučajeva (O/E); relativni rizik (RR); odnos logaritmovanih verovatnoća (LLR), vremenske odrednice početka i završetka formiranja klastera, kao i pokazatelji statističke značajnosti formiranih klastera u vidu p-vrednosti. Analizirani su slučajevi infekcije metodama prostorne analize, vremenske i prostorno vremenske analize. Prostornom analizom detektovana su ukupno dva klastera koji su obuhvatala 2, odnosno 9 lokacija (naseljenih mesta i farmi). Poluprečnik prvog statistički značajnog klastera (p- vrednost $<1 \cdot 10^{-17}$) iznosio je 9,16 km dok je poluprečnik sekundarnog klastera (p- vrednost 0,052) iznosio 23,69 km.

Metodom čiste vremenske analize klastera detektovan je jedan statistički značajan klaster nastao u periodu između 4. 09. 2018. i 20. 10. 2018. godine.

Metodom prostorno-vremenske analize detektovana su dva klastera u periodu između 05.09. 2018. i 20.12. 2018. godine, od kojih je jedan bio statistički značajan dok je drugi, manji klaster identifikovan kao sekundarni klaster.

Tabela 46. Rezultati prostorne klaster analize

Red broj klaster	Ukupno lokacija	Radius, km	Populacija pod rizikom	Br. slučajeva infekcije(O)	Teorijski očekivani broj slučajeva (E)	O/E	RR	LLR	<i>p</i> -vrednost
1	2	9,16	736	84	4,02	20,91	39,92	198,49	<1*10 ⁻¹⁷
2	9	23,69	1,856	21	10,12	2,07	2,22	4,82	0,052

Legenda: O/E- odnos registrovanih i očekivanih slučajeva; RR- relativni rizika; LLR- odnos logaritmovanih verovatnoća;

Tabela 47. Rezultati vremenske klaster analize

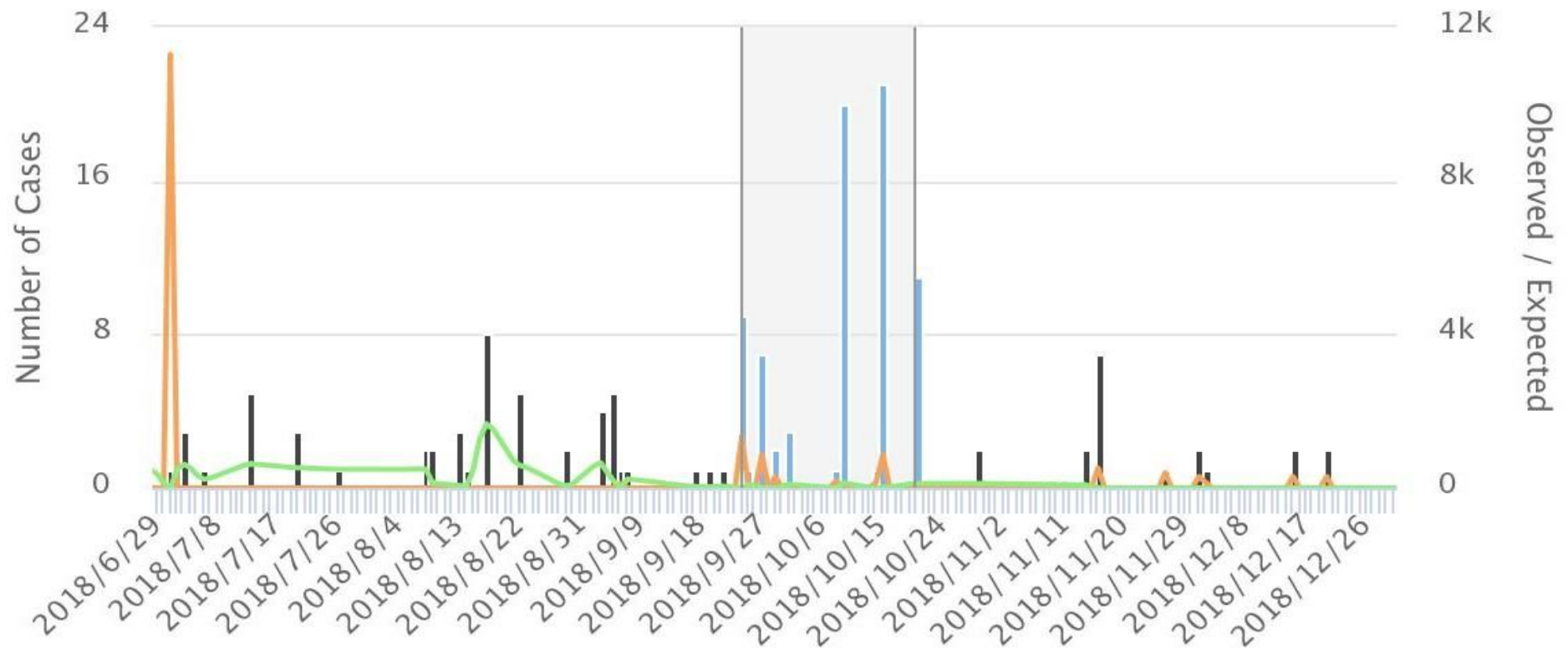
Red broj klaster	Ukupno lokacija	Početak grupisanja	Završetak grupisanja	Broj slučajeva infekcije	Teorijski očekivani broj slučajeva (E)	O/E	RR	LLR	<i>p</i> -vrednost
1	Svi lokaliteti	9/24/2018	10/20/2018	76	2,62	28,97	51,12	201,37	0.001

O/E- odnos registrovanih i očekivanih slučajeva; RR- relativni rizika; LLR- odnos logaritmovanih verovatnoća;

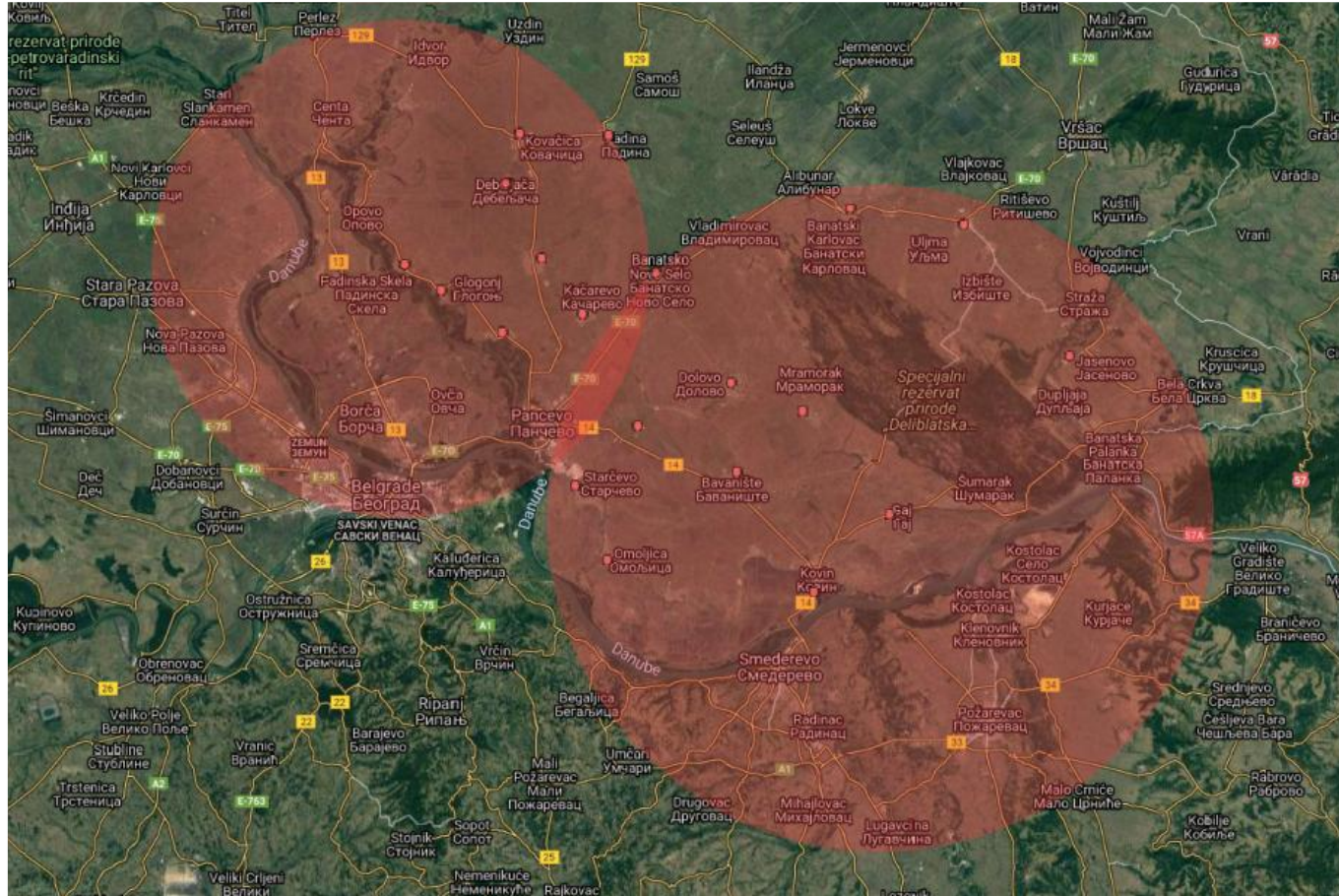
Tabela 48. Rezultati prostorno-vremenske analize klastera

Red br klaster	Ukupno lokacija	Radius, km	Početak grupisanja	Završetak grupisanja	Populacija pod rizikom	Br slučajeva infekcije	Teorijski očekivani br slučajeva (E)	O/E	RR	LLR	<i>p</i> -vrednost
1	12	31,44	9/5/2018	12/20/2018	3,940	91	3,76	24,19	50,24	230,72	<1*10 ⁻¹⁷
2	8	23,37	7/20/2018	25/9/2018	1,692	10	2,50	4,01	4,19	6,55	0,358

Legenda: O/E-odnos registrovanih i očekivanih slučajeva; RR- relativni rizika; LLR- odnos logaritmovanih verovatnoća;

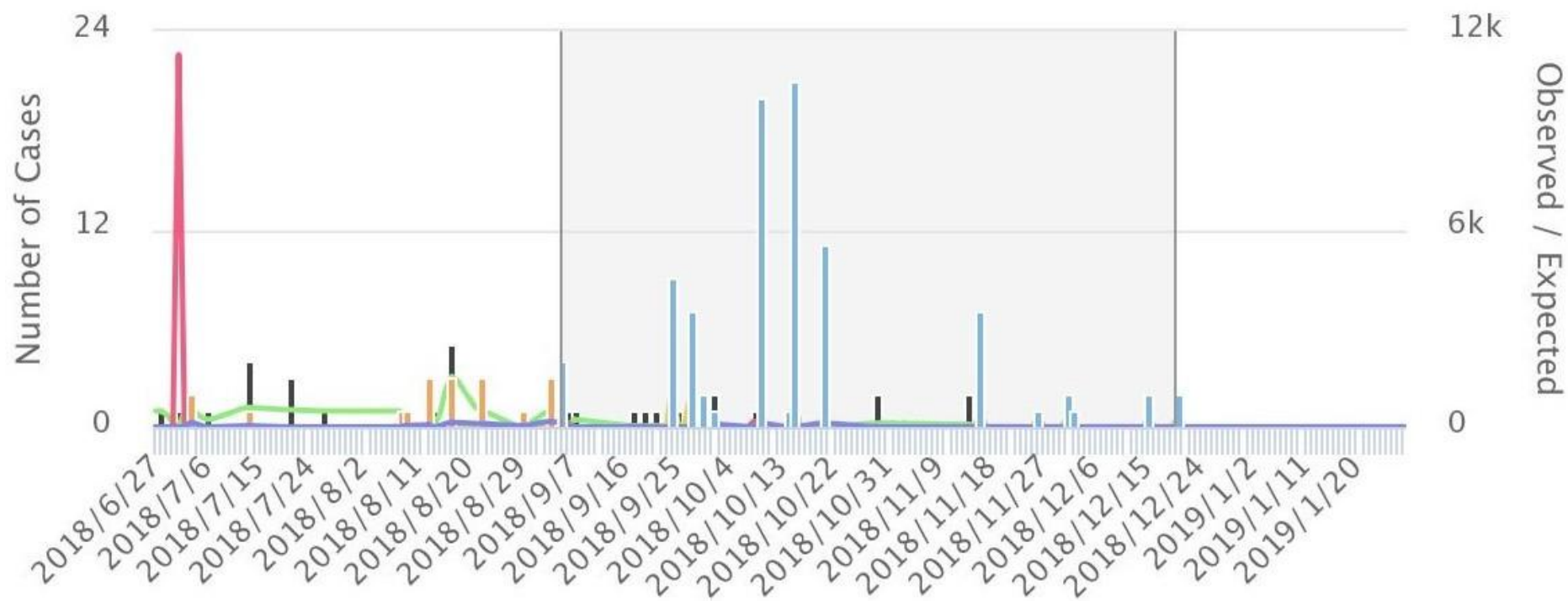


Grafikon 16. Vremenski klaster detektovan u periodu od 24.09.2018-20.10.2018. godine. Klasteri su identifikovani Kuldorfovom statistikom skeniranja, primenom metode spacijalne analize. Plavim stubićima označeni su slučajevi infekcije virusom Zapadnog Nila koji čine vremenski klaster, crni stubići predstavljaju numeričke vrednosti uočenih slučajeva infekcije po danima, zeleni stubići predstavljaju očekivane slučajeve infekcije dok svetlo braon stubići predstavljaju vrednosti odnosa između uočenog broja slučajeva infekcije i očekivanih brojeva inficiranih jedinki po danima.



Kartogram 9. Detektovani prostorno vremenski klasteri prikazani na geografskoj karti Južnobanatskog okruga

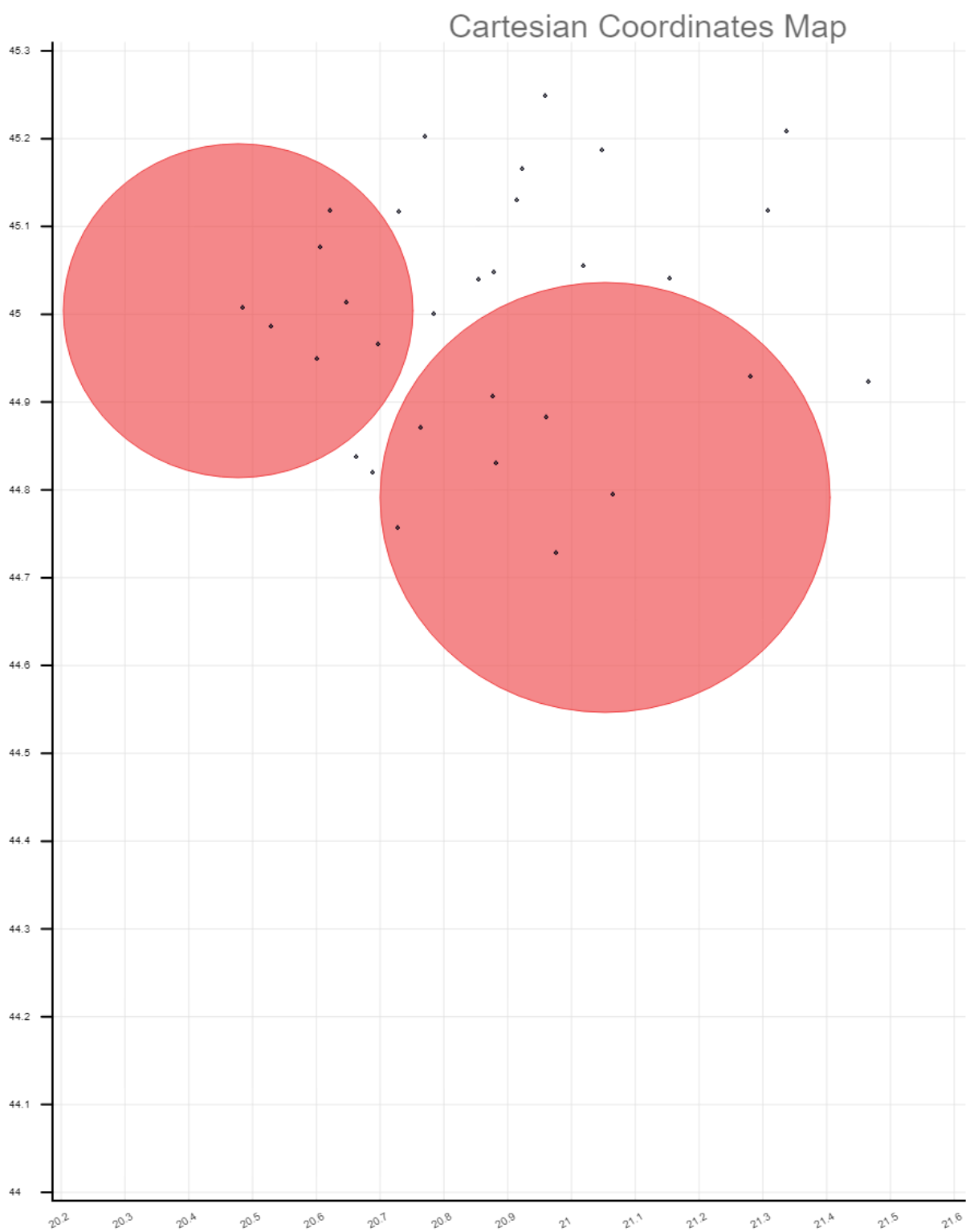
Na Kartogramu 9 je dat kartografski prikaz rezultata Kuldorfove statistike skeniranja – prostorno-vremenske analize slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih životinjskih vrsta i ljudi. Na kartogramu su prikazani detektovani prostorni klasteri. Potrebno je uočiti dva klastera, od kojih je jedan veći i statistički je značajan klaster, dok je drugi manji identifikovan kao sekundarni tip klastera.



Grafikon 17. Detektovani prostorno - vremenski klasteri od 24.09.2018-20.10.2018. godine

Klasteri su identifikovani Kuldorfovom statistikom skeniranja, primenom metode vremensko-prostorne analize. Plavim stubićima označeni su slučajevi infekcije virusom Zapadnog Nila, koji čine vremenski klaster, crni stubići predstavljaju numeričke vrednosti uočenih slučajeva infekcije po danima, zeleni stubići predstavljaju očekivane slučajeve infekcije dok svetlo braon stubići predstavljaju vrednosti odnosa između uočenog broja slučajeva infekcije i očekivanih brojeva inficiranih jedinki po danima.

Na Kartogramu 10 je dat kartografski prikaz rezultata Kuldorfove statistike skeniranja – vremensko-prostorne analiza slučajeva infekcije virusom Zapadnog Nila kod različitih životinjskih vrsta i ljudi prikazanih u Kartezijevom koordinatnom sistemu. Na kartogramu su prikazani detektovani vremensko-prostorni klasteri. Veća kružnica na mapi predstavlja značajni klaster, dok manja kružnica na mapi predstavlja sekundarni klaster. Crne tačke na mapi predstavljaju lokacije gde su registrovani slučajevi infekcije. Na X i Y osama Kartezijevog koordinatnog sistema označene su geografske koordinate severne geografske širine i istočne geografske dužina Južnobanatskog okruga.



Kartogram 10. Detektovani prostorno-vremenski klasteri prikazani u Kartezijevom koordinatnom sistemu

6. DISKUSIJA

Sprovođenje programa nadzora prisustva i aktivnosti virusa Zapadnog Nila kod životinja i ljudi na jednoj teritoriji je od izuzetnog značaja za primenu odgovarajućih mera za suzbijanje i sprečavanje širenja infekcije. Merama nadzora se ostvaruje kako praćenje prisustva virusa u vektorima - komarcima, tako i njegovo prisustvo kod divljih vrsta ptica kao prirodnih domaćina virusa i sentinel vrsta životinja kao što su konji, koji služe kao indikatori za praćenje prisustva i cirkulacije virusa Zapadnog Nila. Imajući u vidu da je infekcija izazvana virusom Zapadnog Nila često prisutna duži vremenski period kod životinja na jednom epizootiološkom području, programe nadzora treba stalno preispitivati. Revizija postojećih modela praćenja (monitoringa) groznice Zapadnog Nila uslovljena je otkrivanjem mogućih faktora rizika i obrazaca prenošenja ove infekcije u populaciji prijemčivih vrsta. Izbor novih, pogodnijih sentinel vrsta životinja, uslovljen je poznavanjem epizootijskog procesa koji se odvija na nivou različitih vrsta i otkrivanjem faktora rizika koji čine određenu vrstu podložnijom za infekciju.

U cilju razumevanja epizootijskog/enzootijskog procesa groznice Zapadnog Nila, primenjen je klasičan model Gordonovog ekološkog trijasa. Pretpostavljeno je da epizootija nastaje onda kada su sve tri komponente modela u odnosu koji pogoduje prenosu virusa i nastanku bolesti. Posebna pažnja posvećena je proceni činilaca spoljne sredine koji doprinose većoj izloženosti prijemčivih vrsta virusu Zapadnog Nila.

Kao faktore rizika koji doprinose nastanku epidemije, odnosno epizootije, identifikovani su: starost, vrsta životinje i tip proizvodnje (uslovi držanja/izloženost komarcima). Životinjske vrste kod kojih je praćeno i analizirano prisustvo infekcije i serokonverzije, grupisane su u različite kategorije, odnosno stratume, u zavisnosti od načina uzgoja i starosti. Pretpostavljeno je da u uslovima ekstenzivne proizvodnje domaćih životinja, kao značajnog, a u pojedinim delovima Južnobanatskog okruga dominantnog načina držanja životinja, postoji veća izloženost komarcima, kao vektorima virusa Zapadnog Nila u odnosu na intenzivni način uzgoja. Pored načina proizvodnje i držanja životinja, ispitivana je i eventualna uzročno posledična povezanost između životinjskih vrsta i stope serokonverzije, odnosno seroprevalencije.

Noviji podaci iz strane literature ukazuju na mogućnost da se u program nadzora virusa Zapadnog Nila na određenoj teritoriji mogu uključiti i druge vrste životinja –sentinel vrste, kao na primer goveda i svinje (Ozkul i sar., 2006, Barbić i sar., 2012, Giadinis i sar., 2015, Escibano-Romero i sar., 2015). Već duže vreme je poznato da se živina, odnosno kokoši mogu koristiti u monitoring programima praćenja pojave infekcije virusom Zapadnog Nila na jednoj teritoriji. Treba pomenuti ispitivanja Rizzoli i sar. (2007) koji su tokom leta 2005. godine prikupili i ispitivali uzorke krvnog seruma kokoši i dokazali prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 90% ispitanih životinja. Na teritoriji Tunisa, Amdoni i sar. (2019) su sprovedli ispitivanja na tri sentinel jata kokoši koja su bila smeštena u tri različita endemska regiona virusa Zapadnog Nila. Sva tri jata su praćena od septembra 2016. godine do januara 2017. godine. Ukupno je ispitano 442 uzorka krvnog seruma poreklom od živine smeštene na severu Tunisa, 392 uzorka krvnog seruma kokoši smeštenih na istočnoj obali Tunisa i 386 uzorka poreklom od kokoši smeštenih u Južnom delu Tunisa. Svi uzorci krvnog seruma su ispitani primenom metode ELISA na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Kod 10,7% uzoraka krvnog seruma živine iz severnog dela Tunisa utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Sličan rezultat je dobijen ispitivanjima uzoraka poreklom od živine smeštene na jugu Tunisa (9,8% pozitivnih uzoraka). Nijedan pozitivan uzorak seruma nije utvrđen kod živine koja je bila smeštena na istočnoj obali Tunisa. Prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila je utvrđeno kod dve kokoši

poreklom sa severa Tunisa. Filogenetskom analizom je ustanovljeno da sojevi virusa poreklom iz Tunisa pripadaju liniji 1 virusa Zapadnog Nila i da su blisko srodni sa italijanskim sojevima virusa čije je prisustvo otkriveno kod komaraca tokom 2016. godine i kod uzoraka poreklom od ptice vrste kobac tokom 2017. godine. U ispitivanju koje su sproveli Ulloa i sar. (2009) od ukupno pregledanog 351 uzorka krvnog seruma konja, pilića, pataka, ćuraka, gusaka, svinja i goveda, kod 36 ispitanih uzoraka je ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. U dva zbirna uzorka komaraca utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Zapadnog Nila. Svi ispitani uzorci su bili poreklom od životinja sa teritorije Chiapas, Meksiko. Tokom 2012. godine Petrović i saradnici (2013) su ispitivali prisustvo virusa Zapadnog Nila na teritoriji severne Srbije tako što su prikupili 133 uzoraka poreklom od divljih ptica. Svi uzorci su prikupljeni u periodu od januara do septembra 2012. godine i ispitani primenom metode ELISA, testa redukcije plakova i metodom *real-time* RT-PCR. Kod 7 od ukupno 92 uzorka krvnog seruma ptica ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila, odnosno kod 8 od 81 ispitanih uzoraka tkiva divljih ptica ustanovljeno je prisustvo virusa Zapadnog Nila. Filogenetskom analizom celog genoma jednog virusnog izolata i dela E regiona genoma ostalih utvrđenih virusa Zapadnog Nila u ovom ispitivanju je utvrđeno da sojevi virusa poreklom iz Srbije pripadaju liniji 2 virusa i da su slični sojevima virusa koji su izazivali infekcije kod ljudi i životinja u Grčkoj, Mađarskoj i Italiji. Značaj divljih ptica kao rezervoara i vektora arbovirusnih zoonoza ističu Michel i sar. (2019). Ovi autori naglašavaju da je prisustvo virusa Zapadnog Nila na teritoriji Nemačke prvi put utvrđeno tokom 2018. godine kod nekoliko vrsta ptica i kod konja. Interesantno je da je prisustvo virusa Zapadnog Nila, odnosno njegova lokalna cirkulacija tokom 2018. godine utvrđena kod sedentarnih i migratornih ptica na teritoriji istočne Nemačke. U našim ispitivanjima koja su sprovedena tokom 2018. godine na pojedinim živinarskim farmama u više opština Južnobanatskog okruga izvršeno je prikupljanje uzoraka krvnog seruma živine koji su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Ni u jednom uzorku krvnog seruma nije utvrđeno prisustvo antitela protiv ovog virusa. Sva ispitana živina bila je izležena posle 01.12.2017. godine i samim tim nije bila u kontaktu sa virusom Zapadnog Nila pre sezone povećane aktivnosti komaraca u 2018. godini. Pored ovoga, u sprovedenim ispitivanjima izvršeno je i prikupljanje 40 uzoraka seruma živine poreklom iz individualnih gazdinstava na teritorijama opština Pančevo i Opovo. Kod živine koja je bila poreklom iz tri individualna gazdinstva na teritoriji Pančeva, odnosno kod životinja poreklom iz jednog individualnog gazdinstva sa teritorije Opova, utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. I u jednom i u drugom naseljenom mestu je utvrđeno prisustvo virusa u komarcima tako da je ovaj rezultat od izuzetnog značaja jer je u direktnoj vezi sa prisustvom specifičnih antitela protiv virusa kod živine. Odsustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima seruma svih ispitanih uzoraka živine gajene u farmskim uslovima ukazuje da nije bilo kontakta farmske živine sa komarcima. Dobijene razlike su bile visoko statistički značajne u odnosu na ekstenzivni način uzgoja živine. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti je su biosigurnosne mera koje se sprovode na farmama efikasne.

I u drugim zemljama, kao što je Turska, su vršena ispitivanja prisustva virusa Zapadnog Nila. Posebno se mogu istaći ispitivanja Ozkul i sar. (2006). Tokom ovih ispitivanja je prikupljeno 40 uzoraka krvnog seruma magaraca, 63 uzorka krvnog seruma mačaka, 100 goveda, 114 pasa, 259 konja, 88 ljudi i 100 ovaca. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo virusa Zapadnog Nila na teritoriji Turske, odnosno dobijeni rezultati su pokazali prisustvo virusa kod magaraca, goveda, pasa, ovaca, ali i kod ljudi. Slična ispitivanja na teritoriji Hrvatske su sproveli Barbić i sar. (2012). U ovim ispitivanjima je potvrđeno prisustvo virusa Zapadnog Nila u uzorcima poreklom od konja i goveda. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se infekcija životinja izazvana virusom Zapadnog Nila prostire

pravcem istok - zapad. Sve do 2012. godine nije bilo podataka o cirkulaciji virusa Zapadnog Nila na teritoriji Alžira. Ispitivanja koja su vršili Davoust i sar. (2016) sprovedena na teritoriji Senegala, odnosno severozapada te zemlje, podrazumevala su prikupljanje uzoraka krvnog seruma ovaca, konja, magaraca, koza, goveda i pasa. Prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila potvrđeno je kod konja, magaraca, pasa, koza. U uzorcima krvnog seruma goveda i ovaca nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Autori ovih ispitivanja smatraju da su konji i magarci - ekvidi i psi pogodne sentinel životinje za monitoring infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila. Lafri i sar. (2017) su tokom ispitivanja koja su podrazumevala prikupljanje uzoraka krvnog seruma od 239 ekvida (konja i magaraca) i ispitivanje različitim dijagnostičkim metodama, dosli do važnih podataka o prisustvu antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Uzorci seruma su prikupljeni sa tri lokacije u severoistočnom delu zemlje i ispitani primenom metode ELISA, odnosno, da bi se izbegla unakrsna reakcija na druge flaviviruse, i imunoblotom kao i virus neutralizacionim testom. Dobijeni rezultati ispitivanja ovih autora su potvrdili prisustvo virusa Zapadnog Nila kod životinja na teritoriji Alžira (19 pozitivnih uzoraka konja i 32 uzorka magaraca). Petrović i sar. (2014) su primenom metode ELISA ispitali 130 uzoraka krvnog seruma konja poreklom sa teritorije Vojvodine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Tokom prikupljanja uzoraka krvnog seruma konja, vršeno je istovremeno i prikupljanje uzoraka komaraca koji su se nalazili u okolini konja od kojih su prikupljeni uzorci krvnih seruma. Uzorci komaraca su ispitani na prisustvo genoma virusa Zapadnog Nila primenom metode *real-time* RT-PCR. Autori ovih ispitivanja naglašavaju da je seroprevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila kod konja u 2012. godine iznosila 49,23% i da je bila značajno veća od prevalencije utvrđene kod konja poreklom sa teritorije AP Vojvodina 2010. godine koja je iznosila 12%. Ispitivanja sprovedena od strane Petrić i sar. (2017) navode da su programi praćenja virusa Zapadnog Nila u AP Vojvodina započeli kod ljudi i komaraca 2005. godine, kod konja 2009. godine i divljih ptica 2012. godine. Dobijeni podaci koji se odnose na cirkulaciju virusa Zapadnog Nila kod životinja i ljudi na teritoriji AP Vojvodine su omogućili implementaciju nacionalnog monitoring programa u koji su bili uključeni komarci, konji i ptice tokom 2014. godine. Treba naglasiti da je ustanovljena korelacija između prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca i oboljenja ljudi tokom 2014. godine, odnosno oboljenja ljudi i prisustva virusa kod divljih ptica i komaraca tokom 2015. godine. Petrović i sar. (2018) su opisali rezultate monitoring programa infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila koji je sproveden tokom 2014. i 2015. godine na području Srbije. U periodu od juna do avgusta 2014. godine u Srbiji je prikupljeno 2020 uzoraka krvnog seruma sentinel konja, a serokonverzija je utvrđena kod 2,57% uzoraka. Od ukupno ispitanih 3809 uzoraka krvnog seruma pilića prikupljenih od juna do septembra 2014. godine, serokonverzija je ustanovljena kod 5,75% uzoraka. Pored navedenih rezultata u ovom radu su prikazani i rezultati programa monitoringa infekcije izazvane virusom Zapadnog Nila koji je sproveden 2015. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je najintenzivnija cirkulacija virusa Zapadnog Nila utvrđena kod konja, kokoši, divljih ptica i komaraca na teritoriji sedam okruga u Vojvodini i Gradu Beogradu.

U ispitivanjima koja su sprovedena u okviru ove doktorske disertacije koja je obuhvatila utvrđivanje prisustva virusa Zapadnog Nila tokom 2017. i 2018. godine izvršeno je prikupljanje uzoraka komaraca sa deset lokacija u opštinama Pančevo i Opovo. Ukupno je ispitano 140 zbirnih uzoraka komaraca (74 uzoraka u 2017. godini i 66 uzoraka u 2018. godini). Uzorci su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR. Prisustvo virusa Zapadnog Nila kod komaraca (7 pozitivnih uzoraka komaraca) je utvrđeno u drugoj polovini jula i u avgustu mesecu 2017. godine, dok je prisustvo virusa kod komaraca u 2018. godini bilo potvrđeno u junu, julu i avgustu mesecu (u svim terminima uzorkovanja) i to ukupno 15 pozitivnih zbirnih uzoraka. U našim ispitivanjima prikupljeni su uzorci krvnog seruma konja

tokom 2017. godine i 2018. godine. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja uzoraka komaraca utvrđeno je značajno prisustvo virusa Zapadnog Nila u 2017. i 2018. godini na teritoriji na kojoj je sprovedena ova studija. Po broju pozitivnih nalaza prisustva virusa Zapadnog Nila kod komaraca posebno se ističe 2018. godina. Ocena je urađena hi-kvadrat testom i Vilkovim G2 testom (testovi nezavisnosti između redova i kolona tabela kontigencije). Hi-kvadrat test iznosio je 4,64 dok je Vilkov G2 statistik iznosio 4,67. Jačina povezanosti izmerena je izračunavanjem Pirsonovog koeficijenta kontigencije i ϕ_c koeficijenta ($C=0,18$; $\phi_c = 0,18$). Ovi testovi su pokazali da je aktivnost virusa i prisustvo inficiranih komaraca u 2018. godini bilo značajnije nego u 2017. godini. Test odnosa šansi je pokazao da je šansa otkrivanja pozitivnih uzoraka u 2018. godini bila 2,8150 puta veća u odnosu na 2017. godinu (ograničena intervalom poverenja od 1,0690 do 7,4134 pri zadatom nivo značajnosti od 95%). Na osnovu ovako dobijenih rezultata izveden je zaključak da je u 2018. godini rizik od obolevanja ljudi i infekcije životinja bio znatno veći, što se i poklapa sa epidemiološkim i epizootiološkim podacima, pa u tom smislu se može zaključiti da je prisustvo virusa Zapadnog Nila u populaciji komaraca ključni indikator povećanog rizika.

Jedan od ciljeva doktorske disertacije obuhvatio je i serološko ispitivanje konja. Konji su bili poreklom iz više opština Južnobanatskog okruga. Uzorci krvnog seruma konja su ispitivani na prisustvo IgM klase što je indikator skorašnje infekcije virusom Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati su pokazali da je u toku monitoringa 2017. godine utvrđen jedan pozitivan konj sa teritorije opštine Vršac, a 2018. godine jedan konj sa teritorije opštine Kovačica. U 2017. i 2018. godini, broj otkrivenih seropozitivnih konja bio je zanemarljivo mali. Nakon poređenja ovih nalaza sa rezultatima prisustva virusa Zapadnog Nila kod ljudi i rezultatima monitoringa kod komaraca, ustanovljeno je da postoji očigledno neslaganje u pronalaženju pozitivnih slučajeva kod sentinel vrsta i dokazanom prisustvu virusa u prirodi. Shodno epidemiološkoj situaciji kod ljudi i nalazima virusa pozitivnih komaraca, ali uzimajući u obzir nalaze kod konja i divljih ptica, postavljena je hipoteza da postoji slabost u postojećem izboru sentinel vrsta koje se koriste za ranu detekciju cirkulacije virusa na području Južnobanatskog okruga. Ovakav nalaz je posledica pre svega činjenice da je kod ljudi registrovano značajno povećanje broja obolelih u 2018. godini u odnosu na broj obolelih u 2017. godini (63 slučaja u 2018. godini, odnosno 5 slučajeva u 2017. godini). Ova razlika u broju obolelih ljudi bila je očigledan dokaz povećane aktivnosti virusa. Identičan obrazac je uočen i kod komaraca.

Konji s obzirom na njihovu visoku prijemčivost na infekciju virusom Zapadnog Nila su se koristili kao sentinel vrsta životinja za praćenje cirkulacije ovoga virusa u većem broju programa nadzora širom sveta i pri tome su se pokazali kao vrlo svrsishodni (Lupulović i sar., 2011, Barbić i sar., 2012, Petrović i sar., 2014, 2018). Iz pomenutog razloga su i u Srbiji korišteni kao sentinel životinje u programima nadzora od 2014 godine (Petrović i sar., 2018). Međutim, u postojećim uslovima u Srbiji se ispostavilo da konji nisu u dovoljnoj meri upotrebljivi kao sentineli za praćenje cirkulacije virusa Zapadnog Nila iz nekoliko razloga: 1. relativno je mali broj konja i neujednačena rasprostranjenost u Srbiji; 2. S obzirom da su visoko osjetljivi na infekciju veliki broj konja je već serološki pozitivan na virus Zapadnog Nila, odnosno imaju specifična antitela protiv ovoga virusa (čak i do 50% jedinki), posebno konji u severnim i centralnim delovima Srbije (Petrović i sar., 2014). Istovremeno, broj mladih konja tj mlade ždrebadi (koji nisu bili izloženi virusu Zapadnog Nila u prethodnim sezonama) je ekstremno mali da bi se oni mogli koristiti u programu nadzora; 3. U najvećem broju slučajeva konji se drže kao životinje za sport ili kao kućni ljubimci, pa vlasnici ne dozvoljavaju uzimanje krvi od njih, a posebno ne višekratno uzorkovanje krvi (mesečno – pa 4 puta godišnje od juna do septembra kako je to već vršeno tokom nadzora). Sve gore navedeno je rezultiralo limitiranom svrsishodnošću upotrebe konja kao sentinel životinja za nadzor cirkulacije virusa Zapadnog Nila na području Srbije. Ovaj problem je bio osnovni

razlog istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, da se ispituju mogućnosti korišćenja druge vrste životinja kao sentinel vrste u budućim programima nadzora virusa Zapadnog Nila.

Pored ovoga, u našim ispitivanjima izvršeno je i prikupljanje uzoraka poreklom od živih i uginulih divljih ptica (22 uzorka u 2017. godini i 54 uzoraka u 2018. godini). Uzorci su bili poreklom od različitih vrsta ptica poreklom sa teritorija više opština Južnobanatskog okruga. Uzorci poreklom od ptica su ispitani primenom metode *real-time* RT-PCR. U 2017. godini nijedan uzorak poreklom od divljih ptica nije bio pozitivan na prisustvo virusa, dok je u 2018. godini je kod jedne ptice iz opštine Vršac ustanovljen pozitivan rezultat. Na osnovu dobijenih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi o cirkulaciji virusa Zapadnog Nila u populaciji divljih ptica na teritoriji na kojoj je sproveden monitoring. Bez obzira na to, dobijeni rezultati ukazuju da je neophodno tokom realizacije programa nadzora prikupiti što veći broj uzoraka poreklom od divljih ptica, zato što dobijeni rezultati ukazuju na dva suprotna zaključka: uginuća ptica se ne prijavljuju nadležnim organima, ili virus nije u stalnoj cirkulaciji u populaciji divljih ptica i da verovatno ne izaziva težu kliničku sliku praćenu uginućem. Imajući u vidu ciljeve i zadatke ove doktorske disertacije, prikupljeni su podaci o registrovanim slučajevima oboljenja izazvanog virusom Zapadnog Nila kod ljudi na području Južnobanatskog okruga u 2017. godini i 2018. godini. Očigledna razlika u broju obolelih ljudi u dve posmatrane godine, ukazuje na potencijalne nedostatke sadašnjeg načina sprovođenja nadzora za koji su odgovorne nadležne stručne službe. Imajući to u vidu, jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio ispitivanje potencijalnih novih sentinel vrsta životinje koje mogu poslužiti za praćenje infekcije izazvane navedenim virusom.

U cilju unapređenja ovog sistema, pretpostavljeno je da je upotrebom životinja gajenih u ekstenzivnim uslovima proizvodnje moguće izvršiti reviziju odabira sentinel vrsta i postojeći uobičajeni pristupa baziran na monitoringu bolesti kod konja, ptica i komaraca proširiti i na druge vrste. Dobijeni rezultati su pokazali da pojedine vrste domaćih životinja imaju potencijal dobrih indikatora prisustva virusa Zapadnog Nila u prirodi i da su pogodne za uključivanje u programe monitoringa. Nakon izvršenih laboratorijskih ispitivanja i sprovođenja detaljnih epizootioloških analiza utvrđeno je da životinje koje se drže na ekstenzivan način predstavljaju izloženu populaciju, te stoga mogu biti dobra dopuna postojećim uobičajenim sentinel vrstama (konji, ptice). Statističkim metodama utvrđeno je da postoji značajna mera povezanosti između načina držanja domaćih životinja i prevalencije infekcija i to pre svega kod životinja gajenih na ekstenzivni način. Kao posebno značajni stratumi ističu se svinje i živina gajeni na ekstenzivan način na seoskim gazdinstvima. Rezultati jasno pokazuju da ekstenzivan način proizvodnje, zbog očigledno niskog nivoa biosigurnosnih mera predstavlja faktor rizika od izloženosti virusu Zapadnog Nila. Kada su upoređeni odnosi seroprevalencije kod goveda i svinja držanih na intenzivan način (OP = 5,02), svinja gajenih na ekstenzivan način i onih koje se gaje na intenzivan način (OP = 5,64) i svinja i živine držanih na ekstenzivan način (OP=1,04), zaključeno je da životinjska vrsta sama po sebi nije značajan faktor rizika i da rizik izloženosti virusu Zapadnog Nila potiče od uslova u kojima se životinje gaje. U prilog tome govori i odnos prevalencija od 1,04 koji je određen kod svinja i živine držane na ekstenzivan način. Utvrđeno je da je kod svinja držanih na ekstenzivan način u odnosu na živinu držanu u istim ekstenzivnim uslovima proizvodnje, rizik veći svega 4%, odnosno može se zaključiti da između ove dve vrste, kada se gaje pod istim uslovima, odnosno u uslovima ekstenzivne proizvodnje, ne postoji statistički značajna razlika verovatnoće infekcije. Međutim, izuzetno visoka razlika odnosa prevalencija koja je utvrđena kod ovih vrsta u odnosu na druge ili iste životinjske vrste držane u intenzivnim uslovima gajenja, čine svinje i živinu vrlo pogodnim indikatorima otkrivanja prisustva virusa. Ovakav zaključak važi u svim slučajevima osim kada su u pitanju goveda koja se drže u intenzivnim uslovima proizvodnje. Za ovakvo zapažanje postoji očigledan razlog, a tiče se

uobičajenog načina držanja goveda na farmama koji podrazumeva da životinje dosta vremena provode na otvorenom.

U cilju realizacije predviđenih ciljeva prikupljani su uzorci krvnog seruma živine (rezultati su već opisani), goveda i svinja. Uzorci krvnog seruma goveda (različitih starosnih kategorija) su prikupljani od životinja sa tri farme na teritoriji Južnobanatskog okruga. Uzorkovanje je izvršeno tokom 2018. godine i 2019. godine. Odabir farmi koje su poslužile za uzorkovanje životinja je bio na osnovu prethodnih rezultata prisustva virusa na teritorijama na kojima se farme nalaze (pojava oboljenja kod ljudi, prisustvo virusa kod komaraca i prisustvo antitela protiv virusa u uzorcima krvnog seruma životinja koja su utvrđena tokom sprovođenja ranijih nadzora). Farma u selu Mramorak, opština Kovin je poslužila kao kontrolna farma s obzirom da u okolini farme nema vodotokova, a ne postoje podaci o prisustvu virusa kod komaraca. Dobijeni rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma goveda tokom 2018. godine potvrdili su prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima krvnog seruma na sve tri farme goveda. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je kod teladi (dva teleta) u starosti od tri meseca potvrđeno prisustvo kolostralnih antitela protiv virusa, a kod istih teladi u starosti od 4 do 5 meseci nisu utvrđena antitela protiv virusa Zapadnog Nila (2019. godina). Kod junica starosti od 8 i 10 meseci je utvrđeno prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila u uzorcima krvnog seruma. Mora se naglasiti da je uzorkovanje kod junica izvršeno u oktobru mesecu što je jasan znak da su nađena antitela dokaz da je do infekcije životinja ili kontakta sa virusom došlo u 2018. godini. Pozitivni uzorci krava su dokaz cirkulacije virusa na farmi, ali s obzirom na to da su životinje bile u starosti od dve do pet godina ne može se sa sigurnošću reći da li je u pitanju infekcija iz 2018. godine ili potiče iz prethodnih godina. Do sličnih rezultata smo došli i kada smo rezultate seroloških ispitivanja analizirali primenom Bajesove mreže. Primenom statističke metode Bajesove mreže utvrđeno je da goveda starija od 24 meseca, svinje uzrasta od 6 do 8 meseci i živina starija od 8 meseci imaju najveću verovatnoću kontakta sa inficiranim komarcima, a samim tim i serokonverzije, u odnosu na životinje drugih uzrasta. Takođe, kada smo poredili povezanost faktora kao što su vrsta, starost i tip proizvodnje, dobijeni rezultati su takođe pokazali visok rizik od infekcije/serokonverzije kod životinja koje se drže u ekstenzivnim uslovima proizvodnje. Kod svinja, koje se drže na ekstenzivan način, utvrđena je verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila od 35,3% a unutar ovog stratuma najveća verovatnoća je određena kod svinja starosti od 6 do 8 meseci (13,05%). Kod svinja koje se gaje na intenzivan način verovatnoća infekcije je 19,16%. Kod živine držane u ekstenzivnim uslovima proizvodnje, utvrđena je verovatnoća infekcije virusom od čak 38,28%, a unutar ovog stratuma najveća verovatnoća je određena kod živine starosti preko 8 meseci i iznosila je 10,14%.

Slična ispitivanja vršili su Gladinis i sar. (2015). Oni su ispitivali uzorke krvnog seruma goveda koji su bili prikupljeni sa klanica raspoređenih u četiri različita regiona Grčke. Prikupljeni uzorci krvnog seruma su zatim ispitivani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila primenom ELISA testa. Od ukupno 156 ispitanih uzoraka krvnog seruma goveda, trideset uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ukazujući time da i goveda mogu biti inficirana virusom Zapadnog Nila i što je još važnije odgovoriti merljivim serološkim odgovorom na infekciju, a što ukazuje na mogućnost potencijalnog korišćenja i ove vrste životinja kao sentinela za praćenje cirkulacije virusa.

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio i ispitivanje mogućnosti korišćenja svinja kao sentinel vrsta za infekciju izazvanu virusom Zapadnog Nila. Uzorci za ispitivanja poreklom od svinja gajenih u farmskim uslovima prikupljeni su na klanicama u opštinama Južnobanatskog okruga i ispitivani na prisustvo antitela protiv virusa Zapadnog Nila. Dobijeni rezultati su potvrdili prisustvo specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma protiv virusa

kod svinja poreklom sa tri različite farme. Uzorci krvnog seruma svinja držanih u individualnim gazdinstvima potvrdili su prisustvo virusa na teritorijama opština Plandište, Opovo i Pančevo. Sve svinje koje su bile uključene u ispitivanje su oprasene (rođene) u 2018. godini kada su ispitivanja i vršena. Ispitivanja koja su vršili Teehee i sar. (2005) i Merino-Ramos i sar. (2018) su pokazala da je u organizmu svinja došlo do pojave serokonverzije posle kontakta sa virusom Zapadnog Nila. Rezultati ovih ispitivanja ukazuju da su u selu Starčevu, opština Pančevo, utvrđeni pozitivni uzorci kod komaraca, živine i svinja na prisustvo virusa Zapadnog Nila, i da je u jednom gazdinstvu kod uzoraka komaraca utvrđeno prisustvo virusa Zapadnog Nila, a kod živine i svinja utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila u 2018. godini.

Da bi se procenila cirkulacija virusa Zapadnog Nila među sisarima u Srbiji, Escribano-Romero i sar. (2015) su ELISA testom i testom neutralizacije virusa ispitali 688 uzoraka dobijenih od 279 domaćih svinja, 318 divljih svinja i 91 srndaća na prisustvo antitela protiv ovoga virusa. Prisustvo specifičnih antitela je utvrđeno ELISA testom kod 43 (15,4%) svinja, 56 (17,6%) divljih svinja i 17 (18,7%) srndaća. Od toga, 6 (14%), 33 (59%) i 4 (23,5%) uzoraka krvnih seruma je bilo potvrđeno i u virus neutralizacionom testu. Autori zaključuju da dobijeni podaci ukazuju na to da bi domaće svinje mogle biti potencijalne sentnel vrste. Takođe autori napominju da su ispitivane svinje bile poreklom sa velikih industrijskih farmi sa zatvorenim i izolovanim zgradama i veštačkom ventilacijom, gde bi infekcija i serokonverzija trebalo da budu manje verovatne nego kod slobodno držanih ili svinja u dvorištu, koje su mnogo izloženije vektorskim ugrizima i verovatno bi mogle biti još bolje kao sentinel životinje.

Doktorskom disertacijom obuhvaćeno je i ispitivanje prisustva maternalnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila kod 33 teladi na farmama Starčevo, Stari Tamiš i Mramorak. Ukupno su ispitana 33 teleta, starosti kod prvog uzorkovanja od 2 do 3 meseca. Za istraživanje su izabrana telad koja su poticala od majki uključenih u ispitivanje različitog serološkog statusa. Krv teladi je uzorkovana dva puta u razmaku od 2 meseca. Serološkim ispitivanjem utvrđeno je da nakon 2-3 meseca po rođenju titar specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ispod praga detekcije ELISA testa. U uzrastu od 4 meseca telad su seronegativna, pa mogu da budu dobra kategorija za ispitivanje aktivnosti virusa Zapadnog Nila u prirodi.

Prostorno vremenskim analizama epizootije groznice Zapadnog Nila i analizom slučajeva infekcije kod životinja 2018. godine, utvrđeno je da su se slučajevi infekcije grupisali shodno određenim obrascima uslovljenim faktorima rizika. Primenom Moranovog I testa globalne autokorelacije, dokazana je relevantnost atributa na nivou čitavog istraživanog geografskog područja, dok su lokalnom autokorelacijom određena mesta gde se grupišu slučajevi infekcije odnosno serokonverzije. Identifikovan je obrazac prostorne distribucije i približni raspon prostorne agregacije (perimetar grupisanja klastera) poluprečnika od 24,5 km. Uočeno je da zone sa povećanim rizikom od infekcije obuhvataju područja koja su bogata stajaćim i tekućim vodama u širem području Grada Pančeva i da se pružaju dužinom reka Dunav i Tamiš, uzvodno i nizvodno, pa je u tom smislu indikovano ove oblasti držati pod stalnim nadzorom. Prostorno vremensko statistikom skeniranja (Kuldorfova statistika skeniranja) identifikovana su tri prostorna, jedan vremenski i tri prostorno vremenska klastera. Identifikovani prostorni klaster se poklapa sa vrućim tačkama koje su identifikovane primenom ArcGIS alata, pa je u tom smislu potvrđeno i ovim testom da se radi o zonama visokog rizika od infekcije virusom Zapadnog Nila. Takođe, analizom slučajeva infekcije u periodu 2017. i 2018. godine identifikovan je vremenski klaster koji je započeo 24.09.2018. a završio se 20.10.2018. godine. Ovakav nalaz nas navodi na zaključak da je u ovom vremenskom periodu bila najintenzivnija aktivnost virusa, odnosno 10 do 15 dana ranije, s

obzirom na potrebno vreme od inficiranja do stvaranja imunološkog odgovora sintezom specifični antitela protiv virusa Zapadnog Nila.

Uzimajući u obzir rezultate osetljivosti i specifičnosti korišćenih seroloških testova, izračunatih na nivou stada, ustanovljeno je da bi i sami laboratorijski testovi mogli da budu jedan od ograničavajućih faktora postojećeg programa monitoringa. S obzirom na to da su osetljivost i specifičnost testova izraženi na nivou zapata životinja, uslovljeni faktorima kao što su veličina uzorka, odnosno veličina zapata odakle uzorak potiče, seroprevalencijom, dijagnostičkom osetljivošću i specifičnošću upotrebljenog testa posmatranom na nivou jedinke, postoji rizik da prisustvo infekcije na malim gazdinstvima ne bude otkriveno. U tom smislu je potrebno voditi računa i o ovim ograničavajućim faktorima prilikom izbora odgovarajućih gazdinstava na kojima bi se vršio odabir sentinel životinja i pratilo prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Zapadnog Nila ako bi se postojeći model monitoringa proširio i uključivanjem svinja i živine gajene na seoskim gazdinstvima.

Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu daljeg ispitivanja mogućnosti korišćenja posebno svinja kao sentinel životinja što bi značilo ispitivanja koja bi trebalo sprovesti u većem obimu i na većoj teritoriji.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Tokom sprovođenja monitoringa u 2017. i 2018. godini, utvrđeno je prisustvo virusa Zapadnog Nila kod komaraca na teritoriji Južnobanatskog upravnog okruga. U 2018. godini prisustvo virusa u komacima je bilo značajno veće, čime je i rizik od obolevanja ljudi i inficiranja životinja bio znatno veći, što je u skladu sa epidemiološkim i epizootiološkim podacima. Stoga se može zaključiti da je prisustvo virusa Zapadnog Nila kod komaraca ključni indikator povećanog rizika.

2. Serološka ispitivanja sprovedena kod konja kao dobre sentinel vrste, pokazala su da je broj životinja sa dokazanim prisustvom IgM antitela tokom monitoringa 2017. i 2018. godine bio zanemarljiv. Dobijeni podaci ukazuju da se na ispitivanom području, konji nisu pokazali kao pouzdana, odnosno svrsishodna sentinel vrsta za monitoring prisustva i aktivnosti virusa Zapadnog Nila u posmatranom periodu. Za potrebe sprovođenja monitoringa se moraju odabrati isključivo seronegativne životinje.

3. Ispitivanja prisustva genoma virusa kod uginulih divljih ptica, bez obzira na statistički mali broj uzoraka, ukazuje da nalaz jedne pozitivne ptice u 2018. godini (1,8% od ukupnog broja ispitanih) zahteva sistematičnije prikupljanje uzoraka poreklom od divljih vrsta koje su jedan od ključnih faktora u održavanju virusa u prirodi.

4. Prostorno-vremenskim analizama epidemije groznice Zapadnog Nila i analizom slučajeva infekcije kod životinja 2018. godine, utvrđeno je da su se klasteri inficiranih životinja grupisali prema određenim faktorima rizika. Identifikovan je obrazac prostorne distribucije i približni perimetar grupisanja statistički značajnih klastera Moranovim I testom koji ima poluprečnik od 24,5 km ($p=0,004141$).

5. Tokom sprovedenog istraživanja, u 2018. godini prostorno-vremenskom statistikom skeniranja (Kuldorfova statistika skeniranja) identifikovana su tri prostorna, jedan vremenski i tri prostorno-vremenska klastera. Identifikovani prostorni klaster se poklapao sa „vrućim“ tačkama, odnosno zonama visokog rizika od infekcije virusom Zapadnog Nila u kojima je potrebno uvesti dodatne mere u cilju prevencije ove bolesti.

8. Rezultati ispitivanja su potvrdili da se goveda mogu uzeti u obzir kao potencijalna sentinel vrsta. Primenom Bajesove mreže utvrđeno je da goveda starija od 24 meseca, imaju najveću verovatnoću kontakta sa inficiranim komarcima, a samim tim i serokonverzije, u odnosu na životinje drugih starosnih kategorija. Utvrđena verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila mladih goveda ispod 12 meseci iznosila 43,98% što ukazuje da se ova kategorija goveda može uzeti u obzir za potencijalne sentinel životinje u sprovođenju praćenja aktivnosti virusa Zapadnog Nila.

9. Ispitivanje dužine trajanja maternalnog imuniteta protiv virusa Zapadnog Nila kod teladi sa tri farme je pokazalo da je on kratkotrajan, što ovu starosnu kategoriju čini pogodnom za ispitivanje prisustva i aktivnosti virusa Zapadnog Nila.

10. Ispitivanje uzoraka krvnog seruma svinja iz ekstenzivnog uzgoja su potvrdila da ova vrsta životinja može se koristiti kao potencijalna sentinel vrsta za monitoring aktivnosti virusa Zapadnog Nila. Na ispitanom uzorku, utvrđena je verovatnoća infekcije virusom Zapadnog Nila od 35,3% a unutar ovog stratuma najveća verovatnoća je određena kod svinja starosti od 6 do 8 meseci (13,05%).

11. Kod živine držane u ekstenzivnim uslovima proizvodnje, Bajesovom mrežom utvrđena je verovatnoća infekcije virusom od čak 38,28%, a unutar ovog stratuma najveća verovatnoća je određena kod živine starosti preko 8 meseci i iznosila je 10,14%. Dobijeni

rezultati potvrđuju ranije nalaze da se živina u ekstenzivnom uzgoju može sa uspehom koristiti kao sentinel vrsta.

12. Poređenjem povezanosti faktora kao što su vrsta, starost i tip proizvodnje, ustanovljen je visok rizik od infekcije/serokonverzije kod životinja koje se drže u ekstenzivnim uslovima proizvodnje, iz čega se može zaključiti da životinjska vrsta sama po sebi nije značajan faktor rizika.

13. Kako su dobijeni rezultati ispitivanja ukazali da svinje gajene u ekstenzivnim uslovima, kao i mlada goveda (oteljena nakon prethodne sezone aktivnosti vektora) gajena u farmskim uslovima proizvodnje, mogu da budu izuzetno korisne vrste za monitoring virusa Zapadnog Nila, revizija postojećih modela prismetre treba da uključi i serološka ispitivanja ovih životinja kao pogodnih sentinel vrsta.

8. LITERATURA

1. Ahmadinejad F. (2012). Circulation du virus West-Nile dans les populations equines d'Iran: impact epidemiologique de l'environnement et du climat. HAL archives-ouvertes, 1-136.
2. Altman D.G. (1991). Practical statistics for medical research. First edition, London: Chapman and Hall.
3. Amdoni J., Monaco F., Portanti O., Sghaier S., Conte A., Hassine T.B., Polci A., Valleriani F., Gennaro A.D., Zoueri M., Savini G., Hammami S. (2019) Detection of enzootic circulation of a new strain of West Nile virus lineage 1 in sentinel chickens in the north Tunisia. *Acta Trop* 202, 105223.
4. Barbić L.J., 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, 504-508.
5. Barros S.C., Ramos F., Fagulha T., Duarte M., Henriques M., Luis T., Fevereiro M. (2011). Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal. *Veterinary Microbiology* 152(3-4), 407-410.
6. Bellini R., Calzolari M., Mattivi A., Tamba M., Angelini P., Bonilauri P., Albieri A., Cagarelli R., Carrieri M., Dottori M., Finarelli A.C., Gaibani P., Landini M.P., Natalini S., Pascarelli N., Rossini G., Velati C., Vocale C., Bedeschi E. (2014). The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill*, 19 (44): pii=20953.
7. Blackmore C.G.M., Stark L.M., Jeter W.C., Oliveri R.L., Brooks R.G., Conti L.A. and Wiersma S.T. (2003). Surveillance results from the first West Nile virus transmission season in Florida, 2001. *Am J Trop Med Hyg*, 69 (2), 141-150.
8. Bolfa P., Jeon I., Loftis A., Leslie T., Marchi S., Sithole F., Beck C., Lecollinet S., Zientara S., Hans A., Issel C.J. (2017). Detection of West Nile virus and other common equine viruses in three locations from the Leeward Islands, West Indies. *Acta tropica* 174, 24-28.
9. Buckley, A., Dawson, A., Gould, E. A. (2006). Detection of seroconversion to West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus in UK sentinel chickens. *Virology journal*, 3(1), 71
10. 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*, 57(3), 211-219.
11. Cardinale E., Bernard C., Lecollinet S., Rakotoharinome V.M., Ravaomanana J., Roger M., Olive M.M., Meenowa D., Jaumally M.R., Melanie J., Heraud J.M., Zientara S., Cetre-Sossah C. (2017). West Nile virus infection in horses, Indian ocean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 53, 45-49.
12. Chaintoutis S.C., Papa A., Pervanidou D., Dovas C.I. (2019). Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004-2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 141.
13. Chaskopoulou, A., Dovas, C. I., Chaintoutis, S. C., Kashefi, J., Koehler, P., & Papanastassopoulou, M. (2013). Detection and early warning of West Nile Virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(10), 723-732.
14. Chaskopoulou, A., L'Ambert, G., Petric, D., Bellini R., Zgomba M., Groen T.A., Marrama L., Bicout D.J. (2016). Ecology of West Nile virus across four European

- countries: review of weather profiles, vector population dynamics and vector control response. *Parasites Vectors* 9, 482.
15. Čobanova V., Šikutova S., Stakova P., Šebesta O., Vichova B., Zubrikova D., Miterpakova M., Mendel J., Hurnikova Z., Hubalek Z., Rudolf I. (2019). Co-circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses*, 11 (7).
 16. Dauphin G., Zientara S., Zeller H., Murgue B. (2004). West Nile: worldwide situation in animals and humans. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 343-355.
 17. Dauphin G., Zientara S. (2007). West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 25(30), 5563-5576.
 18. Davoust B., Maquart M., Roqueplo C., Gravier P., Sambou M., Mediannikov O., Leparc-Goffart I. (2016). Serological survey of West Nile Virus in domestic animals from Northwest Senegal. *Vector Borne and Zoonotic Disease*, Vol. 16, No.5, 359-61.
 19. Del Amo J., Sotelo E., Fernandez-Pinero J., Gallardo C., Llorente F., Agüero M., Jimenez-Clavero M.A. (2013). A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineage 1 and 2, and Usutu virus. *Journal of Virological Methods* 189 (2), 321-327.
 20. Dinu S., Cotar A.I., Panculescu-Gatej I.R., Falcuta E., Prioteasa F.L., Sirbu A., Oprisan G., Badescu D., Reiter P., Ceianu C.S. (2015). West Nile virus circulation in south-eastern Romania, 2011 to 2013. *Euro Surveill*, 20 (20): pii=21130.
 21. Dohoo I., Martin W., Stryhn H. (2009). *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd Edition. Pages: 119-120, 133-134.
 22. Dorko E., Bušova A., Csank T., Feketova E., Rimarova K., Diabelkova J., Čellar R., Bereš M., Gyuranecz M., Pistl J., Bakony T., Jenča A., Jenčova J., Petrašova A. (2018). West Nile virus - a new infection in the Slovak Republic. *Cent Eur J Public Health*, 2018, suppl; S51-S55.
 23. Duggal N.K., Reisen W.K., Fang Y., Newman R.M., Yang X., Ebel G.D., Brault A.C. (2015). Genotype-specific variation in West Nile virus dispersal in California. *Virology* 485, 79-85.
 24. Escribano-Romero E., Lupulović D., Merino-Ramos T., Blazquez A.B., Lazić G., Lazić S., Saiz J.C., Petrović T. (2015). West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary microbiology*, 176(3-4), 365-369.
 25. Faggioni G., De Santis R., Pomponi A., Fantini M., Savini G., Monaco F., Polci A., Bei R., Lista F. (2014). Rapid molecular detection and genotyping of West Nile virus lineages 1 and 2 by real time PCR and melting curve analysis. *Journal of Virological Methods* 207, 54-59.
 26. Folly A.J., Waller E.S.L., McCracken F., McElhinney L.M., Roberts H., Johnson N. (2020). Equine seroprevalence of West Nile virus antibodies in the UK in 2019. *Parasites Vectors* 13, 596.
 27. Forthofer R.N., Lee E.S., Hernandez M. (2007). *Biostatistics a guide to design, analysis, and discovery*. Second edition, Elsevier Inc
 28. Garcia M.N., Hasbun R., Murray K.O. (2015). Persistence of West Nile virus. *Microbes and Infection* 17(2), 163-168.
 29. Giadinis N., Katsoulos P., Chochlakis D., Tselentis Y., Ntais P., Lafi S., Karatzias H., Psaroulaki A. (2015). Serological investigation for West Nile virus, *Anaplasma ovis* and *Leishmania infantum* in Greek cattle. *Veterinaria Italiana*, 51(3), 205-209.
 30. Goddard L.B., Roth A.E., Reisen W.K. and Scott T.W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, No. 12, 1385-1391.

31. Gossner, C. M., Marrama, L., Carson, M., Allerberger, F., Calistri, P., Dilaveris, D., Lecollinet S., Morgan D., Nowotny N., Paty M.C., Pervanidou D., Rizzo C., Roberts H., Schmoll F., Van Bortel W., Gervelmeyer A. (2017). West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Eurosurveillance*, 22(18).
32. Guerrero-Carvajal F., Bravo-Barriga D., Martín-Cuervo M., Aguilera-Sepúlveda P., Ferraguti M., Jiménez-Clavero M.A., Llorente F., Alonso J.M., Frontera E. (2021). Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3), 1432-1444.
33. Kemenesi G., Krtinić B., Milankov V., Kutas A., Dallos B., Oldal M., Somogyi N., Nemeth V., Banyai K., Jakab F. (2014). West Nile virus surveillance in mosquitoes, April to October 2013, Vojvodina province, Serbia: implications for the 2014 season. *Euro Surveill.* 19(16): pii=20779.
34. Komar N. (2001). West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 58-73.
35. Kulldorff M., Heffeman R., Hartman J., Assuncao R., & Mostashari F. (2005). A Space–Time Permutation Scan Statistic for Disease Outbreak Detection. *PloS MeD* 2(3), e59.
36. Kulldorff M., Huang L. & Konty K. (2009). A scan statistic for continuous data based on the normal probability model. *International Journal of Health Geographics*, 8, 58.
37. Kulldorff M. (2018). SaTScan User Guide for version 9.6. <http://www.satscan.org/>
38. Lafri I., Prat C.M., Bitam I., Gravier P., Besbaci M., Zeroual F., Ben-Mahdi M.H., Davoust B., Leparç-Goffart I. (2017). Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North – East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 8-12.
39. Lefrancois T., Blitvich B.J., Pradel J., Molia S., Vachery N., Pallavicini G., Marlenee N.L., Zientara S., Petitclerc M. and Martinez D. (2005). West Nile virus surveillance, Guadeloupe, 2003-2004. *Emerging infectious diseases*, 11(7), 1100-1103.
40. Linke S., Niedrig M., Kaiser A., Ellerbrok H., Müller K., Müller T., Conraths F.J., Mühle R.U., Schmidt D., Köppen U., Bairlein F., Berthold P., Pauli G. (2007). Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg*, 77(2), 358-364.
41. Long M., Jeter W., Hernandez J., Sellon D., Gosche D., Gillis K., Bille E. and Gibbs P. (2006). Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 608-613.
42. Lupulović D., Martín-Acebes M.A., Lazic S., Alonso-Padilla J., Blázquez A. B., Escribano-Romero E., Petrović T. and Saiz, J. C. (2011). First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector-Borne and zoonotic diseases*, 11(9), 1303-1305.
43. Maquart M., Boyer S., Rakotoharinome V.M., Ravaomanana J., Tantely M.L., Heraud J.M., Cardinale E. (2016). High Prevalence of West Nile Virus in Domestic Birds and Detection in 2 New Mosquito Species in Madagascar. *Plos One*, 11(1), 1-10.
44. Martin-Acebes M.A., Saiz J.C. (2012). West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World Journal of Virology*, 1 (2), 51-70.
45. Medić S., Van der Hoven R., Petrović T., Lupulović D., Nowotny N. (2014). Serological evidence of West Nile virus infection in the horse population of northern Serbia. *The Journal of infection in developing countries*, 8(7), 914-918, doi: 10.3855/jidc.3885.

46. Medić S., Lazić S., Petrović T., Petrić D., Samojlović M., Lazić G., Lupulović D. (2019). Evidence of the first clinical case of equine neuroinvasive West Nile disease in Serbia. 2018, *Acta veterinaria* 69(1), 123-130.
47. Merino-Ramos T., Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., Martín-Acebes M.A. (2018) Antibodies to West Nile virus in Mexican pigs, *J Vector Borne Dis* 55(1), 66-67.
48. Michel F., Sieg M., Fischer D., Keller M., Eiden M., Reuschel M., Schmidt V., Schwehn R., Rinder M., Urbaniak S., Muller K., Schmoock M., Luhken R., Wysocki P., Fast C., Lierz M., Korbel R., Vahlenkamp T.W., Groschup M.H., Ziegler U. (2019). Evidence for West Nile and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses*, 11(7), 674, doi: 10.3390/v11070674.
49. Monaco F., Savini G., Calistri P., Polci A., Pinoni C., Bruno R., Lelli R. (2011). 2009 West Nile disease epidemic in Italy: first evidence of overwintering in Western Europe?. *Research in Veterinary Science* 91(2), 321-326.
50. Ozkul A., Yildirim Y., Pinar D., Akcali A., Yilmaz V., Colak D. (2006). Serological evidence of West Nile (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 134(4), 826-829, doi: 10.1017/S0950268805005492.
51. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z. and Nowotny N. (2014). Putative New West Nile virus Lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 20, No. 12, 2119-2122.
52. Pagano M., Gauvreau K. (2000). *Principles of biostatistics*. 2nd ed. Belmont, CA: Brooks/Cole.
53. Petrić D., Petrović T., Hrnjaković Cvjetković I., Zgomba M., Milošević V., Lazić G., Ignjatović Čupina A., Lupulović D., Lazić S., Dondur D., Vaselek S., Živulj A., Kisin B., Molnar T., Janku Đ., Pudar D., Radovanov J., Kavran M., Kovačević G., Plavšić B., Jovanović Galović A., Vidić M., Ilić S., Petrić M. (2017). West Nile virus circulation in Vojvodina, Serbia: mosquito, bird, horse and human surveillance. *Molecular and cellular probes* 31, 28-36.
54. Petrović T., Blazquez A.B., Lupulović D., Lazić G., Escribano-Romero E., Fabijan D., Kapetanov M., Lazis 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. *Eurosurveillance*, 18(44), 20622.
55. Petrović T., Lazić S., Lupulović D., Lazić G., Bugarski D., Vidanović D., Stefan-Mikić S., Milošević V., Hrnjaković-Cvetković I., Petrić D. (2014). Serological study of WNV presence in horses in Vojvodina after the human outbreak in Serbia in 2012. *Arch Biol Sci* 66(2), 473-481.
56. Petrović T., Šekler M., Petrić D., Lazić S., Debeljak Z., Vidanović D., Ignjatović Čupina A., Lazić G., Lupulović D., Kolarević M., Plavšić B. (2018). Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. *PLoS ONE*, 13(4), e0195439.
57. Popović N., Milošević B., Urošević A., Poluga J., Lavadinović L., Nedeljković J., Jevtović D., Dulović O. (2013). Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill.* 18(43), 20613.
58. Rizzoli A., Rosa R., Rosso F., Buckley A., Gould E. (2007). West Nile virus circulation detected in Northern Italy in sentinel chickens. *Vector Borne and Zoonotic Disease*, Vol. 7(3), 411-417.
59. Savini G., Capelli G., Monaco F., Polci A., Russo F., Di Gennaro A. & Pisciella, M. (2012). Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Veterinary microbiology*, 158(3-4), 267-273.

60. Shirato K., Miyoshi H., Kariwa H., Takashima I. (2005). Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *Journal of virological methods*, 126(1-2), 119-125.
61. Silverman B.W. (1986). *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. New York: Chapman and Hall, „How Kernel Density works“: <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/tool-reference/spatial-analyst/how-kernel-density-works.htm>.
62. Teehee M.L., Bunning M.L., Stevens S., Bowen R.A. (2005). Experimental infection of pigs with West Nile virus. *Arch Virol* 150, 1249–1256
63. Therrien C., Fournier E., Ludwig A., Menard J., Charest H., Martineau C. (2019). Phylogenetic analysis of West Nile virus in Quebec, Canada, 2004-2016: Cocirculation of distinct variants harbouring conserved amino acid motifs in North America. *Virology* 537, 65-73
64. Turell M.J., Dohm D.J., Sardelis M.R., Oguinn M.L., Andreadis T.G., Blow J.A. (2005). An update on the potential of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *Journal of medical entomology*, Vol 42, No. 1, 57-62.
65. Ulloa A., Ferguson H.H., Mendez-Sanchez J.D., Danis-Lozano R., Casas – Martinez M., Bond J.G., Garcia-Zebadua J.C., Orozco-Bonilla A., Juarez-Ordaz J.A., Farfan-Ale J.A., Garcia-Rejon J.E., Rosado-Paredes E.P., Edwards E., Komar N., Hassan H.K., Unnasch T.R. and Rodriguez-Perez M.A. (2009). West Nile virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, Mexico. *Vector born and zoonotic diseases*, Vol. 9, No. 5, 555-560.
66. Vázquez A., Herrero L., Negro A., Hernández L., Sánchez-Seco M.P., Tenorio A. (2016). Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. *Journal of virological methods*, 236, 266-270.
67. Wasfi F., Dachraoui K., Cherni S., Bosworth A., Barhoumi W., Dowall S., Chelbi I., Derbali M., Zoghlami Z., Beier J.C., Zhioua E. (2016). West Nile virus in Tunisia, 2014: First isolation from mosquitoes. *Acta Tropica* 159, 106-110.
68. Wodak E., Richter S., Bago Z., Revilla–Fernandez S., Weissenböck H., Nowotny N., Winter P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infection in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary Microbiology* 149(3-4), 358-366.
69. Zink S.D., Jones S.A., Maffei J.G., Kramer L.D. (2013). Quadruplex qRT-PCR assay for the simultaneous detection of Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 77(2), 129-132.

BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandar Živulj

Aleksandar Živulj je rođen 22.11.1974. godine u Pančevu. Osnovnu školu „Vuk Stefanović Karadžić“ u Starčevu završio je 1989. godine, a srednju poljoprivrednu školu „Josif Pančić“ u Pančevu smer veterinarski tehničar 1993.godine. Osnovnu i srednju školu završio je kao odličan učenik. Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1993/94. godine, a diplomirao je 1999. godine s prosečnom ocenom 8,21. Po završetku osnovnih studija, obavio je pripravnički staž u Veterinarskom specijalističkom institutu „Pančevo“ u Pančevu, na poslovima uzorkovanja namirnica i dijagnostike u mikrobiološkoj i serološkoj laboratoriji. Po završetku pripravničkog staža, 2001. godine položio je stručni ispit u Ministarstvu poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. Nakon odsluženja vojnog roka, u periodu od maja do decembra 2002. godine radio je kao veterinar na farmi krava i svinja „Nicco agrar“ u Banatskom Brestovcu na poslovima veterinara. U decembru 2002. godine zaposlio se u Veterinarskom specijalističkom institutu „Pančevo“ u Pančevu, kao epizootiolog, odnosno rukovodilac odeljenja za epizootiologiju.

U septembru 2002. godine upisao je specijalističke studije iz Epizootiologije zaraznih i parazitskih bolesti na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Sve ispite predviđene planom i programom specijalističkih studija položio je s prosečnom ocenom 9,90 i u oktobru 2007. godine odbranio specijalistički rad pod nazivom „Bruceloza u južnobanatskom epizootiološkom području u periodu 1999-2004. godine sa analizom rizika“. U oktobru 2013. godine upisao je Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i položio je planom i programom predviđene ispite s prosečnom ocenom 9,33. Aleksandar Živulj je autor i koautor više od dvadeset radova koji su izlagani na stručnim savetovanjima ili objavljeni u naučnim i stručnim časopisima; bio je aktivni učesnik mnogobrojnih stručnih skupova.

Član je Srpskog veterinarskog društva kao i Sekcije za zoonoze koja radi u okviru ovog udruženja. Član je Veterinarske komore Srbije. Od 2007. godine poseduje Licencu za obavljanje veterinarske delatnosti.

Aleksandar Živulj je bio učesnik brojnih edukacija koje je organizovalo Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije: USDA, FAO, radionice iz oblasti zaraznih bolesti životinja u organizaciji TAIEX, kao i radionice koje Evropska Unija organizuje u cilju kontrole i praćenja slinavke i šapa (EU FMD). Pohađao je obuku za afričku kugu svinja i trening za trenere u organizaciji FAO. Član je nekoliko stručnih grupa Ministarstva poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede čiji je cilj kontrola i suzbijanje zaraznih bolesti životinja. Aktivno je učestvovao u dijagnostici i suzbijanju enzootske leukoze goveda, bruceloze preživara, tuberkuloze goveda i živine, bolesti plavog jezika i drugih zaraznih bolesti životinja na Južnobanatskom epizootiološkom području.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani **Aleksandar V. Živulj**

Broj upisa 15/23

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje potencijalnih sentinel vrsta životinja u nadzoru groznice Zapadnog Nila

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

U Beogradu 10.8.2021.

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Aleksandar V. Živulj

Broj upisa 15/23

Studijski program Doktorske studije veterinarske medicine

Naslov rada **Ispitivanje potencijalnih sentinel vrsta životinja u nadzoru groznice Zapadnog Nila**

Mentori: Prof dr Sonja Radojičić,

Dr Tamaš Petrović

Potpisani Aleksandar V. Živulj

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

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

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

U Beogradu 10.8.2021.

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Ispitivanje potencijalnih sentinel vrsta životinja u nadzoru groznice Zapadnog Nila

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative commons) za koju sam se odlučio/la.

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista)

U Beogradu 10.8.2021.

Potpis doktoranda