



Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

Zadnja sprememba: 10. 08. 2022 16:04:08

A. Podatki o raziskovalnem projektu

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

| | |
|--|---|
| Šifra in naziv | V4-1803 - Detekcija virusov influence tipa A v okoljskih vzorcih, krmi in nastilju ter priprava algoritma za diagnostiko influence pri prašičih |
| Vodja | 22446 - Brigita Slavec |
| Naziv težišča v okviru CRP | 1.2.1 - Detekcija virusov influence tipa A v okoljskih vzorcih, krmi in nastilju ter priprava algoritma za diagnostiko influence pri prašičih |
| Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela | 1247 |
| Cenovna kategorija | D |
| Obdobje trajanja | od 1. 11. 2018 do 30. 04. 2021 |
| Nosilna raziskovalna organizacija | 406 - Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta |
| Raziskovalne organizacije - soizvajalke | 614 - Prirodoslovni muzej Slovenije |
| Raziskovalno področje po šifrantu ARRS | 4 - Biotehnika 4.04 - Veterina 4.04.02 - Animalna patologija in epizootiologija |
| Družbeno-ekonomski cilj | 08 - Kmetijstvo |
| Raziskovalno področje po šifrantu FORD | 4 - Kmetijske vede 4.03 - Veterina |

2. Sofinancerji

DODAJ

B. Rezultati in dosežki raziskovalnega projekta

3. Povzetek raziskovalnega projekta

SLO

S pojavom visoko patogenega virusa aviarne influence (HPAI) podtipa H5N1 iz linije A/gos/Guangdong (Go/GD/96) v letu 1996 se je zaskrbljenost strokovne javnosti močno povečala. Virusi te linije povzročajo pri perutnini in pticah pandemije po celem svetu, poleg tega pa tudi okužbe ljudi, ki so trenutno omejene predvsem na Azijo in Afriko ter tudi drugih sesalcev po celem svetu. V Sloveniji smo HPAI prvič potrdili spomladi 2006 pri prostoživečem labodu grbcu. Sledila sta izbruha HPAI v sezoni 2016/17 in 2020/21. Četrty izbruh HPAI je bil v sezoni 2021/2022, ko smo poleg pozitivnih primerov HPAI pri prostoživečih vodnih pticah, prvič potrdili HPAI pri domači perutnini in celo pri belem dihurju. Perutninarstvo je v Sloveniji ena večjih kmetijskih panog, zato je zaščita tega sektorja pred izbruhi HPAI pomembna. Podobno velja tudi za prašičerejo. Za slovenske razmere so značilne manjše kmetije, kjer skupaj vzrejajo perutnino in prašiče, kar je lahko vzrok za nastanek novih podtipov virusov influence (IAV), potencialno nevarnih tudi za ljudi. Da bi lahko učinkovito ukrepali in preprečili širjenje IAV, je hitro odkrivanje bolezni in poznavanje epidemiologije zelo pomembno. V okviru projekta smo realizirali zastavljene cilje: 1) Potrdili smo, da je vzorčenje okolja (brisi opreme, sten, tal) zelo dobra alternativa klasičnim vzorcem kot so brisi odvzeti živalim. V brisih okolja smo uspešno dokazali različne viruse IAV na farmah prašičev, v hlevu konj, kot tudi v zunanem okolju kjer so se zadrževale prostoživeče vodne ptice. Primerljivi vzorec brisa tal je tudi vzorčenje s prevlekami za čevlje. Poleg tega, da takšen način vzorčenja ni stresen za živali, lahko z njim viruse IAV zaznavamo več tednov po tem, ko se pri živalih ne izločajo več. Poleg vzorčenja okolja smo dokazali, da lahko z različnim načinom združevanja brisov odvzetim živalim, prihranimo čas odvzema kot priprave vzorcev za diagnostiko. 2) V okviru projekta smo pregledali 140 rej prašičev (700 vzorcev pitancev) in ugotovili, da je bilo 48% oziroma 57% rej, odvisno od uporabljenega testa ELISA, serološko pozitivnih. Prevladoval je podtip H1N1, ki smo ga s primerjavo genoma razvrstili v skupino aviarnim sevom podobnih virusov prašičje influence. 3) Visok odstotek (47% oziroma 67%, odvisno od testa) serološko pozitivnih živali na IAV smo potrdili pri 101 testiranemu prostoživečemu labodu grbcu (Cygnus olor) iz SV Slovenije. Kar 56% testiranih ptic je imelo protitelesa proti podtipu H5 ugotovljenimi s testom ELISA. Pri izbruhih HPAI v Evropi je za epizootiološko oceno ogroženosti potrebno upoštevati areal labodov, ki se pojavljajo v Sloveniji. Na osnovi 1697 najdb obročkanih labodov so sosednje države, zlasti območja ob meji, ter Češka, Z Slovaška in J in osrednja Poljska ključna pri presoji ogroženosti Slovenije. Pri izbruhu HPAI v Sloveniji je treba upoštevati tudi aktivno komunikacijo ptic med in vzdolž povodji Zg. Save, Savinje in Drave.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta

V okviru projekta smo si zastavili tri glavne cilje in jih uspešno realizirali.

1. Optimizirati in ugotoviti uporabnost različnih metod vzorčenja za detekcijo respiratornih virusov pri perutnini in prašičih ter te metode preskusiti tudi v okolju, kjer se zadržujejo prostoživeče vodne ptice.

S primerjavo uporabe različnih brisov smo dokazali, da je uporaba suhih brisov zelo dobra alternativa brisom z medijem, predvsem za detekcijo virusa z molekularnimi metodami. Še posebej so se izkazali brisi iz štrlečih najlonskih vlaken, ki smo jih primerjali z bombažnimi brisi in bombažnimi brisi v mediju. V vzorcih brisov iz umetnih vlaken smo virusno RNA potrdili pri 10x nižji koncentraciji in v več ponovitvah v primerjavi z drugima dvema testiranima brisoma. Izolacija virusa je bila pri vseh treh tipih brisov negativna. Uporaba suhih brisov se je dobro izkazala tudi na terenu, ko smo s simulacijo detekcije RNA virusov, v našem primeru cepilnega seva virusa infektivnega bronhitisa (IBV) in bakterije Mycoplasma synoviae (MS), na farmi nesnic testirali različne načine odvzemov in načine združevanja brisov pri kokoših, kot tudi odvzem brisov okolja (tla, napajalnik, krmilnik, ventilator). Ugotovili smo, da je bilo združevanje brisov za oba povzročitelja celo bolj uspešno kot analiza individualnih vzorcev. Pri

diagnostiki virusa RNA smo dobili boljše rezultate z združevanjem brisov ptic (5 ptic/bris), pri diagnostiki MS pa so se boljše izkazali združeni individualni brisi (5 brisov/vzorec). Uspešno smo RNA virusa IB dokazali tudi v vzorcih okolja. Za zelo uporabne so se pokazali brisi tal, saj smo z njimi v vseh šestih testiranih objektih ugotovili virusno RNA. Žal pa se v našem primeru vzorci okolja niso izkazali primerni za detekcijo MS, saj so bili vsi vzorci negativni, medtem ko smo MS dokazali v brisih orofarinksa v vseh 6 objektih. Namesto simulacije ugotavljanja različnih respiratornih virusov v rejah prašičev smo za preizkušanje testiranja izkoristili izbruh influence pri konjih v sezoni 2019/2020. V okviru projekta smo prvič potrdili virus influence pri konjih podtipa H3N8. Za namen detekcije IAV smo opravili deset tedenskih vzorčenj, vzorčili smo konje (nosni bris) in hlevske prostore. Za detekcijo IAV smo uporabili suhe brise iz umetnih vlaken. Virus smo pri vseh konjih potrdili še 6 dni po začetku okužbe, medtem ko smo bili brisi sten obeh hlevov v pozitivni še 48 oz. 62 dan po potrjeni okužbi. Namesto vpojnih prevlek, za katere so že dokazali, da so primerni za vzorčenje objektov za detekcijo IAV, smo uporabili cenovno ugodne in dostopne polietilenske prevleke za čevlje. Ugotovili smo, da v paru prevlek, ki ga namočimo v 50 ml pufla, ne zaznamo inhibitorjev, ki bi vplivali na obratni prepis in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) v realnem času. Takšna priprava vzorca je tudi enostavna in hitra. Ker smo uporabili zelo nizke koncentracije virusa IAV, je bila izolacija virusa neuspešna. Z metodo RT-PCR v realnem času smo pri vzorcu prevlek s koncentracijo ELD50 0,5 x 103,3 /ml virusa zaznali s 66% uspešnostjo in pri koncentraciji virusa ELD50 0,5 x 102,3 /ml s 33% uspešnostjo. Prevleke za čevlje so se izkazale kot zelo dober način vzorčenja na perutninski farmi za detekcijo virusne RNA (IBV), saj smo v vseh 6-tih testiranih objektih z njimi dokazali najvišjo koncentracijo virusne RNA. Prevleke smo uporabili tudi za vzorčenje zunanjih površin obrežja reke Drave in pobežja Koseškega bajerja, kjer je bila v sezoni 2020/2021 potrjena visoko patogena aviarna influenza. Na obrežju Drave nismo zaznali IAV; ne v brisih iztrebkov in površine, kot tudi ne v vzorcu prevlek, čeprav so bili vzorci odvzeti mestih, ki so bila vidno kontaminirana z iztrebki vodnih ptic. Na obrežju in bližnji okolici Koseškega bajerja smo vzorčenje izvajali tedensko en mesec. V vzorcih brisov in prevlek smo s PCR potrdili različne viruse IAV, nizko patogen in visoko patogen podtip H5, nevraminidazni podtip N1 in N5. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da so za vzorčenje okolja primerne tako prevleke kot brisi, vendar moramo izbrati površine, ki so vidno kontaminirane z izločki ptic. V okviru raziskave smo testirali tudi možnost vzorčenja krme. V vzorcih krme nismo zaznali inhibitorjev, ki bi vplivali na molekularno detekcijo virusa ali izolacijo virusa na kokošjih embriih. Za detekcijo virusov smo uporabili tudi vzorčevalnik zraka, ki se v naši študiji ni izkazal za učinkovitega, ne pri detekciji IBV in MS na farmah kokoši nesnic, kot tudi ne IAV v hlevu s pozitivnimi konji.

2. Zaradi velikega pomena prašičev v ekologiji virusov influence menimo, da je potrebno ugotoviti, kateri tipi virusov krožijo v Sloveniji ter pripraviti protokole vzorčenja za terenske veterinarje ter gradivo za osveščanje rejcev in druge laične javnosti, kako ravnati ob primeru pojava influence pri prašičih.

V Sloveniji smo prvič potrdili in z določitvijo genoma determinirali virus prašičje influence podtipa H1N1. Cel genom smo določili štirim virusom iz treh od štirih pozitivnih rej. S primerjavo genomov smo ugotovili, da sta virusa iz dveh rej (reja 1 in reja 6) skoraj identična, medtem ko je virus iz reje 2 drugačen. Zaporedje nukleotidov gena za hemaglutinin ima med temi virusi le 88% podobnost. Kljub razlikam vsi sevi spadajo v skupino aviarnim sevom podobnih virusov prašičje influence, ki so v evropskih državah pogosto prisotni. Eden od glavnih ciljev je bila tudi priprava protokola za vzorčenje prašičev v primeru suma okužbe z IAV. Protokol smo pripravili po smernicah, ki ga priporočajo v priložnikih: Influenza A virus of swine (OIE Terrestrial Manual 2015), Collection of Specimens from Swine for the Detection of Influenza A Virus by Molecular Assays or Virus Isolation (OFFLU Swine Influenza Virus Technical Working Group). Naknadno smo ugotovili, da je poleg standardnega vzorčenja živali zelo uporaben tudi odvzem brisa površin. Brisi okolja so se izkazali kot zelo uporabni, saj z njimi lahko dlje časa spremljamo prisotnost virusne RNA v objektu, medtem ko prašiči izločajo virus le omejen čas. Prevalenco okužb z IAV smo ugotavljali z detekcijo protiteles proti IAV v serumih pitancev, ki so po odstotku pozitivnih živali, takoj za odraslimi plemenskimi svinjami. Pregledali smo 700 vzorcev serumov iz 140 rej, ki so bili odvzeti v okviru Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja zdravstvenega stanja živali, programov izkoreninjenja bolezni živali ter cepljenj živali v letu 2018 in 2019 in so bili primarno odvzeti za dokaz protiteles proti virusu hepatitisa E. Uporabili smo dva različna ELISA testa proizvajalcev IDEXX in IDvet za detekcijo protiteles proti IAV pri različnih živalskih vrstah. Z ELISA IDEXX testom je bilo pozitivnih 33,86% vzorcev in z ELISA IDvet testom pa 36,57% vzorcev serumov. Z obema testoma skupaj je pozitivno reagiralo 30% vzorcev. Zaradi razlik v odstotku pozitivnih vzorcev s posameznim ELISA testom, smo analizirali podatke še po rejah. Ugotovili smo, da je bilo 45% rej pozitivnih z obema testoma, 57% z IDEXX ELISA testom in 48% z IDvet ELISA testom. Pri testiranju različnih kategorij prašičev je bil odstotek pozitivnih plemenskih svinj 52 do 40%, pitancev 43-33% in tekačev 12-8%, odvisno ali smo uporabili ELISA IDEXX ali IDvet test. Da bi ugotovili podtip virusa, proti kateremu imajo prašiči protitelesa, smo uporabili test inhibicije hemaglutinacije in kot antigene uporabili H1N1, H1N2 in H3N2. Pri 35% vzorcih, ki so bili pozitivni v ELISA testu, smo dobili pozitivno reakcijo z enim od testiranih antigenov. Najvišji odstotek pozitivnih reakcij je bil potrjen z antigenom podtipa H1N1 (78% pozitivnih vzorcev), 22% vzorcev je reagiralo s H3N2. Reakcij s podtipom H1N2 nismo ugotovili.

3. Pri pojavih HPAI v Sloveniji so bili najbolj prizadeti labodi grbci (Cygnus olor), kar je lahko posledica večje dovzetnosti populacije za okužbo IAV. Namen projekta je bil preveriti epidemiološko situacijo pri labodih grbcih na območjih SV Slovenije. Preučili smo tudi njihovo dinamiko gibanja in s tem pridobili podatke o kritičnih točkah možnih prenosov na teh območjih.

V okviru projekta smo z analizo podatkov obročkanih labodov grbcov proučili dinamiko gibanja teh ptic v Sloveniji. Za ogled in urejanje prostorskih podatkov in oblikovanje zemljevidov smo v ArcGIS/ArcMap izdelali distribucijske karte najdb obročkanih labodov grbcov (Cygnus olor) za hitro vizualno oceno ogroženosti pri pojavljanju in izbruhih HPAI pri labodih v Evropi in Sloveniji. Med v Sloveniji obročkanih labodih grbcih smo obročke teh ptic v tujini odčitali 610 krat (261 različnih osebkov) in v domovini 749 krat (445 različnih osebkov). Najdbe v Sloveniji obročkanih labodov so po tujini razpršene na 10 evropskih držav. Največ različnih osebkov, 71,3%, je bilo odčitanih v Avstriji, Madžarski in Poljski. V teh državah, v obratnem vrstnem redu, je tudi največ odčitavanj. Najdbe v Sloveniji obročkanih labodov so vtujini razpršene na 10 evropskih držav. Distribucija najdb obročkanih ptic kaže na očiten vpliv Alpske bariere in odsotnost najdb iz vzhoda Panonije. Ker labod grbec južneje od Save ne gnezdi in ta reka v oblikuje rob evropskega areala prezimovanja vrste, je odsotnost najdb obročkanih ptic južneje od Slovenije pričakovana. Na lokaciji obročkanka smo labode v domovini odčitali 550 krat (303 osebkov) na lokacijah drugod po državi pa 199 krat (142 osebkov). Pozimi (dec-feb) je bilo opravljenih 63,4% vseh odčitavanj. Na temelju lokalnih najdb sklepamo, da sta oblikovana dva tipa pojavljanja: prvi nakazuje zvestobo lokalitete obročkanka (2/3 grbcov) in drugi, ki govori o pojavljanju na lokalitetah vzdolž povodij ali med povodji rek (1/3 grbcov). Pri slednjem tipu odčitavanja obročkanih grbcov kažejo na komunikacijo pod Alpskim lokom vzhod-zahod oz. zahod-vzhod ter pričakovano na komunikacijo vzdolž povodja Save, Savinje in Drave. Komunikacija med Muro, Spodnjo Savo in Obalo z drugimi povodji v Sloveniji ni ugotovljena ali je zelo šibka. Na osnovi 338 odčitavanj v obdobju 1972-2018 je bilo v Sloveniji identificiranih 163 različnih osebkov iz tujine. Obročanki so bili v 9 evropskih državah. Kar 75,4% vseh ptic izvira iz Hrvaške, Madžarske in Poljske. Najpomembnejši lokaliteti tujih najdb sta Maribor (23%) in Ptuj (18,5%). Območja iz katerih izvirajo najdbe v tujini obročkanih labodov najdenih v Sloveniji (ptice obročkane v topli polovici leta v času gnezditve in golitve) se geografsko prekrivajo z rezultati najdb v Sloveniji obročkanih osebkov. Za proučevanje prevalence IAV pri labodih z virološkimi in serološkimi metodami smo vzorčili 95 labodov grbcov, 6 jih je bilo vzorčenih dvakrat, tako da smo skupaj odvzeli 101 vzorec brisov in krvi. V brisih kloake smo IAV potrdili v 2% preiskanih vzorcev, odstotek pozitivnih ptic je primerljiv s podatki iz drugih držav. Zaradi nizke koncentracije virusa, podtipa IAV nismo uspeli določiti. Protitelesa proti virusu influence tipa A smo z ELISA testom proizvajalca IDEXX potrdili v 47% in z ELISA testom proizvajalca IDvet v 62% vzorcev serumov labodov grbcov. Oba ELISA testa sta namenjena detekciji protiteles proti tip A influence pri različnih živalskih vrstah. S specifičnim ELISA testom za detekcijo protiteles proti IAV podtipa H5 smo protitelesa ugotovili v 56% vzorcev. Z uporabo testa inhibicije hemaglutinacije smo serume testirali na 16 različnih hemaglutininskih podtipov IAV, za detekcijo protiteles proti podtipu H5 smo uporabi dva visoko patogena seva H5N8 in H5N1 ter en nizko patogeni sev H5N3. Največ vzorcev je pozitivno reagiralo na podtip H6N1 (40%), H13N6 (32%), H5N3 (29%), H5N8 (29%), H5N1 (28%), H9N9 (20%), H8N4 (12%) in H16N3 (11%). Pri odraslih labodih je v HIT testu z dvema ali več podtipi reagiralo 52% testiranih vzorcev in 22% serumov odvzetih mladim labodom, ti serumi so reagirali največ z dvema različnima podtipoma IAV. Skupno je na dva ali več podtipov IAV pozitivno reagiralo 48% vzorcev.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev

V okviru projekta smo uspešno realizirali pričakovane rezultate:

R1. S primerjavo uporabe različnih brisov smo ugotovili, da so suhi brisi alternativa brisom z dodanim medijem. S suhimi brisi smo uspešno zaznali viruse IAV.

R2. Prevleke za čevlje so primerne za vzorčenje in diagnostiko različnih virusov, tako na farmah kot v zunanjem okolju. V laboratoriju smo pripravili enostaven in hiter protokol za odvzem vzorca in za pripravo vzorca v laboratoriju.

R3. V okviru raziskave smo testirali tudi možnost vzorčenja krme, pri kateri nismo zaznali inhibitorjev, ki bi vplivali na molekularno detekcijo virusa ali izolacijo virusa na kokošjih embriih. Vendar bi bilo potrebno opraviti dodatna testiranja, da bi ugotovili primerno količino vzorca, pri kateri bi z gotovostjo izključili odsotnost virusa. Za detekcijo virusov smo uporabili tudi vzorčevalnik zraka Coriolis (Bertin Instruments), ki se v naši študiji ni izkazal za učinkovitega, kar pa ne pomeni, da takšen način vzorčenja ni primeren z uporabo drugega tipa sorodnega aparata.

R4. Pridobili smo podatke o prevalenci in podtipih virusov influence pri prašičih, ki so prisotni v Sloveniji. Prvič smo tudi dokazali in določili virus

influence pri prašičih.

R5. Pripravili smo protokol za odvzem vzorcev prašičem na terenu ter standardne operativne postopke za serološko in molekularno ugotavljanje IAV pri prašičih. Protokoli služijo za redno diagnostiko influence pri prašičih kot tudi za diferencialno diagnostiko v primeru okužbe z aviarnimi sevi IAV na mešanih gospodarstvih.

R6. Z molekularnimi metodami smo ugotovili 2% prevalenco IAV pri labodih grbcih, primerljiva s stanjem v drugih državah. Odstotek serološko pozitivnih ptic je v primerjavi z virološko prevalenco veliko višji, vključno s protitelesi proti podtipu H5, in se med sezonami vzorčenja razlikuje. Za boljše razumevanje dinamike virusa bi bilo potrebno, predvsem na območjih z večjim številom labodov med prezimovanjem, uvesti več letni serološki monitoring, zlasti pri pticah, ki zahajajo v urbana okolja in imajo v stike z ljudmi.

R7. Z analizo najdb obročkanih labodov grbcev, kot enega ključnih aktivnih in pasivnih vektorjev AI v naravi, smo prvič pridobili izjemno pomembne informacije na osnovi katerih lahko izdelamo oceno tveganja za morebitno širjenje HPAI v Sloveniji.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine

V delovnem sklopu 2: »Ugotoviti in implementirati najbolj ustrezen način vzorčenja v terenske pogoje s simulacijo za detekcijo drugih patogenih ali cepnih virusov sevov, ki jih detektiramo v rejah piščancev in prašičev«, smo namesto simulacije na prašičji farmi izkoristili izbruh IAV pri konjih v hlevih Veterinarske fakultete. V hlevih in pri konjih smo opravili večkratno testiranje, ki je potekalo v tedenskih razmikih 68 dni. V Sloveniji smo prvič potrdili virus influence konj in vpeljali diagnostiko za klinične vzorce. Pridobili smo veliko informacij o detekciji virusa v okolju, saj takšen način vzorčenja v rejah konj še ni opisan in je zelo dobra alternativa za dokaz povzročitelja veliko dlje, kot pa s klasičnim načinom odvzema vzorcev - nosnih brisov konj.

V okviru 30-mesečnega projekta smo enkrat zaprosili za vključitev novih sodelavcev (en sodelavec iz partnerske ustanove Prirodoslovnih muzejev Slovenije in ena tehnična sodelavka iz Veterinarske fakultete) ter enkrat za izključitev sodelavca iz Veterinarske fakultete zaradi prenehanje delovnega razmerja.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnost

Naslov (Title) SLO

Prašičja influenza

Naslov (Title) EN

Swine influenza

Opis (Description) SLO

Prašičja influenza (PI) se pojavlja povsod po svetu. Poleg ekonomskega pomena, ki ga ima pri prašičih, okužbe z virusom PI predstavljajo pomembno potencialno grožnjo javnemu zdravstvu. Prašiči naj bi imeli pomembno vlogo kot vmesni gostitelji pri nastajanju novih sevov virusov influence A, ki bi lahko povzročili pandemijo pri ljudeh. Najpogosteje se virus prenaša z neposrednim stikom med okuženo in dovzetno živaljo ali kapljično. Pri prašičih je najpogostejša pot okužbe preko nosnega kontakta. Možen je prenos virusa PI tudi s posrednim stikom, predvsem z obleko, obutvijo, opremo, ki so bili v kontaktu z okuženimi prašiči. O PI govorimo, kadar opazimo več kliničnih primerov bolezni pri prašičih, ki imajo povišano telesno temperaturo, zmanjšan apetit, kašljajo ali kihajo, oteženo dihanje, imajo prisoten izcedek iz nosu in oči ter so se ti klinični znaki razvili v enem tednu in prizadeli vsaj 10 % živali v enoti. Ne obstaja specifično zdravilo zoper PI, zato so bistveni preventivni oz. biovarnostni ukrepi, ki se uporabljajo pri preprečevanju in širjenju okužb z virusom PI. Epidemiološka slika okužb prašičev z virusi influence A je v zadnjem desetletju v Sloveniji praktično nepoznana. Kateri virusi influence krožijo v populaciji prašičev v Sloveniji ter kje in koliko časa se virusi v reji zadržujejo, je bil eden od ciljev raziskovalnega projekta z naslovom: Detekcija virusov influence tipa A v okoljskih vzorcih, krmi in nastilju ter priprava algoritma za diagnostiko influence pri prašičih (V4-1803). V okviru tega projekta smo na prisotnost protiteles proti virusu PI preiskali skupno 851 vzorcev seruma prašičev, z območja celotne Slovenije. Vzorce smo testirali z encimsko imuno adsorpcijsko preiskavo – testom ELISA, s katerim ugotavljamo specifična protitelesa proti virusu influence tipa A. Na območju Slovenije smo pri preiskavi vseh vzorcev ugotovili, da je 36,08 % prašičev imelo protitelesa proti PI. Iz leta 2017 smo preiskali skupno 180 serumov, 60 od plemenskih svinj in enako število od pitancev in tekačev. Glede na kategorijo, je bilo pozitivnih 60 % plemenskih svinj, 46,67 % pitancev in 16,67 % tekačev. V letih 2018 in 2019 smo vzorce jemali izključno pri pitancih, med katerimi je bilo 41,10 % vseh pozitivnih na prisotnost protiteles

Opis (Description) EN

In the last decade, the epidemiological situation of influenza A virus (IAV) infections in Slovenia, especially in domestic pigs, was unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of influenza viruses and the most common subtypes in Slovenian pig herds. In 2019, we tested a total of 738 serum samples of fatteners for presence of antibodies against IAV. All samples were tested with IDEXX Influenza A Virus Ab Test Kit (IDEXX, The Netherlands) and ID Screen® Influenza A Ab Competition Multi-species Kit (ID-Vet, France). 143 positive samples were re-tested with the hemagglutination inhibition (IHA) test. For virological investigation 114 nasal swab samples and 35 environmental swab samples (pool samples from feeders, drinkers, enrichment material) from 6 farms with reported respiratory problems were collected. Two farms were sampled twice 14 days apart. Real-time RT-PCR was used for determination of M gene (AI-M) and for determination of H1, H3, N1 and N2 subtypes. Antibodies against IAV were detected in 35,23% and 37,67% of the serum samples using IDEXX kit and ID-Vet kit respectively. The most prevalent subtype was H1N1 (70%), followed by H3N2 subtype (30%), H1N2 subtype was not detected. Subtype H1N1 was confirmed in 4 out of 6 herds in nasal and environmental swabs. The average Ct value for nasal swabs was 22,8 and 30,6 for environmental swabs. Re-testing of two herds after 14 days showed lower percentage of positive nasal swabs and higher average Ct value (34,3). Despite a 2,4% difference in percentage of positive results between both ELISA kits, antibodies against IAV were detected in almost all herds with both tests. When testing the environmental swabs, we were able to confirm IAV in all positive herds. Therefore, environmental samples could be beneficial for IAV detection, although the Ct values were higher compared to animal samples.

Objavljeno v (Published in)

Kmetijska družba; Kmetovalec; 2021; Letn. 89, št. 8; str. 8-9; Avtorji/Authors: Golinar Irena, Slavec Brigita, Plut Jan, Štukelj Marina;

Šifra

COBISS ID
75916035

Leto
2021

Tipologija (Tipology)
1.04 - Strokovni članek (Professional Article)

Naslov (Title) SLO

Influenca pri prašičih in navodila za odvzem vzorcev za dokaz virusa influence tipa A

Naslov (Title) EN

Swine influenza and Instructions for nasal swabbing

Opis (Description) SLO

V okviru raziskovalnega projekta z naslovom: Detekcija virusov influence tipa A v okoljskih vzorcih, krmi in nastilju ter priprava algoritma za diagnostiko influence pri prašičih (V4-1803) smo za veterinarje pripravili navodila, kako naj ob sumu na prašičjo influenco odvzamejo nosne brise prašičem. Poleg omenjenega je tudi natančno zapisano koliko brisov naj odvzamejo na farmi glede na velikost reje oz. farne in glede na odstotek prevalenčne meje zaupanja.

Opis (Description) EN

In the project entitled »Detection of Influenza A viruses in environmental samples, feed and litter, and setting of an algorithm for the diagnosis of influenza in pigs« we prepared the protocol for veterinarians on how to carry out the sampling when suspecting SI outbreak. We also described the necessary quantity of the obtained samples in relation to the number of animals on the farm and suspected disease prevalence.

Objavljeno v (Published in)

Veterinarska zbornica Slovenije; Vestnik Veterinarske zbornice Slovenije; 2020; Letn. 15, št. 3; str. 173-178; Avtorji/Authors: Golinar Irena, Štukelj Marina, Slavec Brigita;

Šifra

COBISS ID
32203779

Leto
2020

Tipologija (Typology)
1.04 - Strokovni članek (Professional Article)

Naslov (Title) SLO

Influenza A v slovenskih prašičjih čredah

Naslov (Title) EN

Influenza A in Slovenian pig herds

Opis (Description) SLO

V zadnjem desetletju epidemiološka situacija okužb domačih prašičev z virusom influence A (IAV) v Sloveniji ni bila znana. Zato je bil cilj raziskave ugotoviti prevalenco virusov influence in najpogostejše podtipa v slovenskih rejah prašičev. V letu 2019 smo testirali skupno 738 serumov pitancev na prisotnost protiteles proti IAV. Vsi vzorci so bili testirani z IDEXX Influenza A Virus Ab Test Kit (IDEXX, Nizozemska) in ID Screen® Influenza A Ab Competition Multi-species Kit (ID-Vet, Francija). 143 pozitivnih vzorcev smo ponovno testirali s testom inhibicije hemaglutinacije (IHA). Za virološko preiskavo je bilo zbranih 114 vzorcev nosnih brisov in 35 vzorcev brisov iz okolja (vzorci krmilnikov, napajalnikov, obogatitvenega materiala) iz 6 rej kjer so prašiči imeli respiratorne motnje. Dve reji sta bili vzorčeni dvakrat v razmiku 14 dni. RT-PCR v realnem času smo uporabili za določanje gena M (AI-M) in za določanje podtipov H1, H3, N1 in N2. Protitelesa proti IAV so bila dokazana v 35,23 % in 37,67 % vzorcev seruma s kompletom IDEXX in kompletom ID-Vet. Najpogostejši podtip je bil H1N1 (70 %), sledi podtip H3N2 (30 %), podtip H1N2 nismo odkrili. Podtip H1N1 je bil potrjen v 4 od 6 rej v nosnih in okoljskih brisih. Povprečna vrednost Ct za nosne brise je bila 22,8 in 30,6 za okoljske brise. Ponovno testiranje dveh farm po 14 dneh je pokazalo nižji odstotek pozitivnih nosnih brisov in višjo povprečno vrednost Ct (34,3). Kljub 2,4 % razliki v odstotku pozitivnih rezultatov med obema kompletoma ELISA, so protitelesa proti IAV z obema testoma odkrili v skoraj vseh čredah. Pri testiranju okoljskih brisov smo lahko potrdili IAV v vseh pozitivnih čredah. Zato bi lahko bili okoljski vzorci koristni za odkrivanje IAV, čeprav so bile vrednosti Ct višje v primerjavi z nosnimi brisi.

Opis (Description) EN

In the last decade, the epidemiological situation of influenza A virus (IAV) infections in Slovenia, especially in domestic pigs, was unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of influenza viruses and the most common subtypes in Slovenian pig herds. In 2019, we tested a total of 738 serum samples of fatteners for presence of antibodies against IAV. All samples were tested with IDEXX Influenza A Virus Ab Test Kit (IDEXX, The Netherlands) and ID Screen® Influenza A Ab Competition Multi-species Kit (ID-Vet, France). 143 positive samples were re-tested with the hemagglutination inhibition (IHA) test. For virological investigation 114 nasal swab samples and 35 environmental swab samples (pool samples from feeders, drinkers, enrichment material) from 6 farms with reported respiratory problems were collected. Two farms were sampled twice 14 days apart. Real-time RT-PCR was used for determination of M gene (AI-M) and for determination of H1, H3, N1 and N2 subtypes. Antibodies against IAV were detected in 35,23% and 37,67% of the serum samples using IDEXX kit and ID-Vet kit respectively. The most prevalent subtype was H1N1 (70%), followed by H3N2 subtype (30%), H1N2 subtype was not detected. Subtype H1N1 was confirmed in 4 out of 6 herds in nasal and environmental swabs. The average Ct value for nasal swabs was 22,8 and 30,6 for environmental swabs. Re-testing of two herds after 14 days showed lower percentage of positive nasal swabs and higher average Ct value (34,3). Despite a 2,4% difference in percentage of positive results between both ELISA kits, antibodies against IAV were detected in almost all herds with both tests. When testing the environmental swabs, we were able to confirm IAV in all positive herds. Therefore, environmental samples could be beneficial for IAV detection, although the Ct values were higher compared to animal samples.

Objavljeno v (Published in)

European College of Porcine Health Management; 2022; Str. 178; Avtorji/Authors: Golinar Irena, Slavec Brigita, Plut Jan, Štukelj Marina;

Šifra

COBISS ID
108971779

Leto
2022

Tipologija (Typology)
1.12 - Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (Publis

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine

V okviru projekta smo pripravili standardne postopke za molekularno diagnostiko influence pri prašičih in konjih ter za določanje različnih hemaglutininskih (H1-H16) in nevraminidaznih podtipov (N1-N9). Vpeljali in optimizirali smo različne metode vzorčenja za detekcijo respiratornih patogenov s poudarkom na virusih influence pri živalih - perutnini, prašičih in konjih, hkrati pa tudi v različnih vzorcih iz njihovega okolja. Pridobljena znanja omogočajo skrajšanje časa odvzema kot tudi priprave vzorcev za diagnostiko, s čemer smo optimizirali celoten diagnostični postopek. V okviru projekta smo pripravili tudi protokol za tovrstna vzorčenja namenjena veterinarskim delavcem za potrebe diagnostike virusov influence pri prašičih.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine

10.1. Pomen za razvoj znanosti

SLO

Virusi influence tipa A (IAV) so zaradi svoje sposobnosti okužb živali in ljudi ter povzročanja pandemij temeljito proučevani, še vedno pa o njih ne vemo vsega. S svojim spreminjanjem, nastajanjem novih kombinacij ter nepričakovanim pojavljanjem in možnostjo okužbe različnih gostiteljev nas IAV vedno znova presenečajo. Pridobivanje novih podatkov o ekologiji virusa v različnih okoljih in pri različnih gostiteljskih vrstah so izjemnega pomena. V okviru projekta smo v Sloveniji prvič potrdili virus prašičje influence in virus influence konj. Z metodo odvzema brisov površin, kjer se zadržujejo živali, smo potrdili, da lahko IAV v brisih površine sten, opreme in tal zaznamo še več tednov po tem, ko se virusi pri živalih ne izločajo več. Kot zelo uporabne za vzorčenje tal v zaprtih prostorih in tudi v zunanem okolju so se izkazale tudi polietilenske prevleke za čevlje. Takšen način vzorčenja je hiter, neinvaziven za živali in je uporaben tako za epidemiološke študije kot tudi za potrditve suma bolezni. Epidemiološki podatki o prekuženosti prašičev z IAV v Evropi so v primerjavi s podatki pri perutnini in pticah sila skopi; opravljene so bile sicer posamezne študije, ki kažejo, da v nekateri evropskih državah krožijo 3 različni podtipi virusov: H1N1 aviarnega izvora in H3N2 ter H1N2 humanega izvora. Z obsežno analizo vzorcev prašičev smo ugotovili, da je 34% do 37% vzorcev pitancev serološko pozitivnih na IAV. Prevladuje podtip H1N1, ki spada v skupino aviarnih sevom podobnih virusov prašičje influence. Virusni genom smo uspeli določiti direktno iz kliničnih vzorcev in tako dopolnili informacije tudi iz našega območja. Pridobljene informacije in izkušnje bomo koristno vključili tudi v nov COST projekt, v katerem smo sodelujoči partner. Z obsežno analizo podatkov o obročanih labodih grbcih med leti 1972 in 2018, smo pridobili pomembne informacije o migracijah labodov v Sloveniji

kot tudi izven naših meja, kar nam omogoča razumeti možne poti širjenja virusa. Čeprav je narejenih veliko študij o prevalenci IAV pri prostoživečih pticah, smo v okviru našega projekta opravili eno najbolj natančnih analiz serumov labodov grbccev z uporabo 16 hemaglutininskih podtipov IAV v Evropi. Pridobili smo izjemno zanimive podatke za širšo strokovno javnost kot tudi izkušnje v diagnostiki IAV, ki omogočajo učinkovitejši nadzor.

ANG

Influenza A viruses (IAVs) are the subject of intense research because of their ability to infect animals and humans and because they can cause major pandemics, but we still do not know everything about them. With their variability, formation of new combinations and unintentional emergence along with their ability to infect different hosts, IAVs continue to surprise us. Gaining new information about the ecology of the virus in different environments and in different host species remains of paramount importance. In this project, we confirmed and characterised swine and equine influenza viruses for the first time in Slovenia. For virus detection, we introduced a new method that involves sampling the environment where animals are kept - swabs from the surface of walls, equipment, and floors. Using this sampling method, we were able to detect avian influenza viruses for several weeks after the viruses were no longer excreted by the animals. Polyethylene boot swabs have proven to be very suitable for floor/soil sampling both indoors and outdoors. Such a sampling method is rapid, non-invasive to the animals, and useful for epidemiological studies as well as for confirming suspected disease. Compared to birds and poultry, epidemiological data on IAV infections in pigs are rare and less comprehensive. The results of some individual studies suggest that 3 different subtypes of viruses circulate in some European countries: H1N1 of avian origin and H3N2 and H1N2 of human origin. In the extensive study of fattening pigs, we confirmed that 34% to 37% of the samples were serologically positive for IAV. We were able to identify the viral genome directly from clinical samples. The results showed that the H1N1 subtype, which belongs to the group of avian strain-like viruses of swine influenza, is predominant in Slovenia. The information and experience gained in this project will also be useful for the new project COST, in which we are a partner. Through comprehensive analysis of data on ringed mute swans from 1972 to 2018, we have obtained important information on the migrations of this bird species in Slovenia as well as beyond borders, which allows us to better understand the possible pathways of introduction and spread of the virus in Slovenia. Although many studies have been conducted on the prevalence of IAV in free-living birds, our project carried out one of the most detailed serological analyses of samples collected from mute swans, using 16 different IAV hemagglutinin subtypes. The project has provided us with extremely valuable data of interest to the professional community and the public, as well as invaluable experience important for IAV diagnostics.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije

SLO

Perutninarstvo v Sloveniji predstavlja eno večjih kmetijskih panog, zato je učinkovita zaščita tega sektorja pred izbruhi kužnih bolezni še kako pomembna. Po drugi strani je slovenska prašičjereja v precej nezavidljivem položaju; samooskrba s prašičjim mesom je v naši državi pod 30 %. Načini intenzivne reje zaradi svojih značilnosti zahtevajo specifični pristop pri ohranjanju zdravja živali in preprečevanju okužb. V perutninskem sektorju gre večinoma za večje aglomeracije živali na relativno majhnem prostoru, kar omogoča izjemno hitro širjenje različnih patogenov in širjenja bolezni. Podobna situacija je tudi v intenzivnih rejah prašičev, čeprav v manjši meri.

V zadnjem desetletju so izbruhi okužb z visoko patogenimi virusi aviarnе influence (HPAI) vse pogostejši in situacija je zelo resna. HPAI ni več sezonska bolezen, ampak se pojavlja skozi vse leto. Zaskrbljujoče so tudi okužbe s temi virusi pri drugih živalskih vrstah, še posebej pa možnost preskoka na ljudi. HPAI je ena od bolezni, ki pri perutnini in pticah povzroča visoke pogine, okužba se tudi izjemo hitro širi in bolezen se pri perutnini zatira z najstrožjimi ukrepi – depopulacijo okuženih jat. To povzroča velike ekonomske izgube, trpljenje živali in velik ekonomski kot tudi socialno zdravstveni problem pri ljudeh. Cepiva se zaenkrat v Evropi ne uporabljajo. Zaradi vseh teh dejstev je izjemnega pomena hitra in učinkovita diagnostika ter njena optimizacija, ki je v izjemnih razmerah - v primeru množičnih izbruhov- še kako pomembna, da bi lahko učinkovito omejili širjenje. Osnova za uspešno načrtovanje ukrepov pa je poznavanje ekologije virusa.

V okviru projekta smo preučili ekologijo virusov influence na področju SV Slovenije pri labodih grbcih. To je območje, kjer je intenzivna reja perutnine zelo razvita in je populacija perutnine izjemno velika, hkrati pa je tudi populacija prostoživečih vodnih ptic na tem področju največja, kar predstavlja enega od pomembnih dejavnikov za vnos bolezni. Z epidemiološko raziskavo kroženja IAV v populaciji labodov grbccev, ki so eden najpogostejših vrst ptic okuženih z virusi IAV pri nas, in z raziskavo njihovega gibanja smo pridobili pomembne podatke o kritičnih točkah možnih prenosov na področju Slovenije. Analiza pridobljenih podatkov pristojnim veterinarskim organom in veterinarski stroki kot tudi perutninski panogi v celoti pomaga pri načrtovanju in izvajanju učinkovitih preventivnih ukrepov IAV v rejah perutnine.

Optimizirali in preučili smo uporabnost različnih metod vzorčenja za detekcijo respiratornih patogenov s poudarkom na virusih influence pri živalih - perutnini, prašičih in konjih, hkrati pa tudi v različnih vzorcih iz njihovega okolja. Pridobljena znanja omogočajo v prvi vrsti vzrejo živali z visokim nivojem dobrobiti (zaradi neinvazivnega odvzema vzorcev za laboratorijsko diagnostiko), skrajšanje časa odvzema kot tudi priprave vzorcev za diagnostiko, s čimer smo optimizirali celoten diagnostični postopek in posledično preprečevanje širjenja bolezni. V okviru projekta smo pripravili tudi protokol za tovrstna vzorčenja namenjena veterinarskim delavcem za potrebe diagnostike virusov influence pri prašičih. To pomeni pomemben strokoven napredek za veterinarsko stroko, hkrati pa bo pomagalo rejcem izboljšati proizvodne rezultate in s tem izboljšati konkurenčnost in rentabilnost reje.

ANG

Intensive poultry production in Slovenia is one of the most important agricultural sectors, which is why effective protection of this sector against the outbreak of infectious diseases is of great importance. Due to its characteristics, intensive farming requires a special approach to animal health maintenance and disease prevention. In poultry sector, large numbers of animals in a relatively small space predominate, which allows the spread of various diseases in a very short time. The situation is similar in intensive pig production, although to a lesser extent.

Over the past decade, outbreaks of highly pathogenic avian influenza (HPAI) infections have become more frequent, and the situation is very serious all over the world. The fact is that HPAI is no longer a seasonal disease, but it occurs throughout the year. HPAI is among the diseases that cause high mortality in poultry and other birds' species. The infection spreads rapidly, and the most serious control measures such as mass depopulation of infected flocks are applied. Unfortunately, prophylactic vaccination is currently not allowed and used in Europe. These cause great losses, with important negative impact on animal welfare, and consequently an important economic problem. Moreover, infections with IAV in other animal species are also of concern, as is the possibility of transmission to humans. Due to all these facts, it is extremely important to fasten and optimise diagnostic procedures which is of great importance in the cases of mass outbreaks to efficiently limit the spread of the disease.

The basis for successful planning of control measures is knowledge of the ecology of the virus. Within the project we investigated the ecology of avian influenza viruses in wild mute swans in the northeast area of Slovenia. This is an area where intensive poultry farming is highly developed and the poultry population is extremely large; moreover, the population of wild waterfowl is the largest in this region, which is one of the most important factors for disease introduction. With an epidemiological study of the circulation of IAV in the population of mute swans, which are one of the most common bird species infected with IAV in Slovenia, and by studying their movements, we have obtained data on the critical points of possible transmission in Slovenia. The analysis of the obtained data will help the competent veterinary authorities and veterinary professions, as well as the poultry industry, to plan and implement effective IAV preventive measures in poultry. We optimised and examined the usefulness of different sampling methods for the detection of respiratory pathogens with emphasis on influenza viruses in animals (poultry, pigs and horses), and in different matrices from their environment. The acquired knowledge allows to shorten the sampling time as well as the preparation time of samples needed for diagnostics, which allowed to optimise the whole diagnostic procedure. As part of the project, we also developed a protocol for this type of sampling for veterinarians to diagnose influenza viruses in pigs. This represents a significant progress for the veterinary profession and at the same time helps breeders to improve their production results and thus increase the competitiveness and profitability of farming.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Interes po doseženih spoznanjih so izkazali nosilci kmetijske dejavnosti in veterinarske organizacije.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

v mednarodnih znanstvenih krogih pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami:

Aktivno sodelovanje z Referenčnim laboratorijem za diagnostiko aviarnе influence Evropske unije. Sodelovanje pri CA20806 – EUROPEAN SWINE INFLUENZA NETWORK (ESFLU).

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:

Izmenjava informacij in udeležba na znanstvenih in strokovnih srečanjih.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

| Cilj | |
|---|--|
| F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin | |
| Zastavljen cilj | <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| Rezultat | Dosežen |
| Uporaba rezultatov | Uporabljen bo v naslednjih 3 letih |
| F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj | |
| Zastavljen cilj | <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| Rezultat | Dosežen |
| Uporaba rezultatov | Uporabljen bo v naslednjih 3 letih |
| F.03 Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja | |
| Zastavljen cilj | <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| Rezultat | Dosežen |
| Uporaba rezultatov | Delno |
| F.04 Dvig tehnološke ravni | |
| Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| Rezultat | Ni dosežen |
| Uporaba rezultatov | Ni uporabljen |
| F.05 Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja | |
| Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| Rezultat | Ni dosežen |
| Uporaba rezultatov | Ni uporabljen |
| F.06 Razvoj novega izdelka | |
| Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| Rezultat | Ni dosežen |
| Uporaba rezultatov | Ni uporabljen |
| F.07 Izboljšanje obstoječega izdelka | |
| Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| Rezultat | Ni dosežen |

Cilj

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.08 Razvoj in izdelava prototipa

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.10 Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.11 Razvoj nove storitve

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.12 Izboljšanje obstoječe storitve

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.13 Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.14 Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.15 Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.16 Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Cilj

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi,

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.19 Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.20 Ustanovitev novega podjetja ("spin off")

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.22 Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.23 Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.24 Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.25 Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Cilj

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.26 Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

Uporabljen bo v naslednjih 3 letih

F.28 Priprava/organizacija razstave

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.29 Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.30 Strokovna ocena stanja

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

Uporabljen bo v naslednjih 3 letih

F.31 Razvoj standardov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.32 Mednarodni patent

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.33 Patent v Sloveniji

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.34 Svetovalna dejavnost

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

| | | |
|-------------------|--------------------|--|
| Cilj | Uporaba rezultatov | Uporabljen bo v naslednjih 3 letih |
| F.35 Drugo | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| | Rezultat | Ni dosežen |
| | Uporaba rezultatov | Ni uporabljen |

Komentar

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

| Vpliv | | |
|--------------|--|---|
| G.01. | Razvoj visokošolskega izobraževanja | |
| G.01.01. | Razvoj dodiplomskega izobraževanja | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.01.02. | Razvoj podiplomskega izobraževanja | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.01.03. | Drugo <input type="text"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02. | Gospodarski razvoj | |
| G.02.01 | Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.02. | Širitev obstoječih trgov | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.03. | Znižanje stroškov proizvodnje | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.04. | Zmanjšanje porabe materialov in energije | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.05. | Razširitev področja dejavnosti | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.06. | Večja konkurenčna sposobnost | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.07. | Večji delež izvoza | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.08. | Povečanje dobička | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.09. | Nova delovna mesta | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.10. | Dvig izobrazbene strukture zaposlenih | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.11. | Nov investicijski zagon | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.02.12. | Drugo <input type="text"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.03. | Tehnološki razvoj | |
| G.03.01. | Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.03.02. | Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.03.03. | Uvajanje novih tehnologij | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.03.04. | Drugo <input type="text"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.04. | Družbeni razvoj | |
| G.04.01 | Dvig kvalitete življenja | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.04.02. | Izboljšanje vodenja in upravljanja | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.04.03. | Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.04.04. | Razvoj socialnih dejavnosti | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.04.05. | Razvoj civilne družbe | <input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |

| Vpliv | | |
|--------------|--|---|
| G.04.06. | <input type="text" value="Drugo"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.05. | Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.06. | Varovanje okolja in trajnostni razvoj | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.07. | Razvoj družbene infrastrukture | |
| G.07.01. | Informacijsko-komunikacijska infrastruktura | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.07.02. | Prometna infrastruktura | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.07.03. | Energetska infrastruktura | <input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.07.04. | <input type="text" value="Drugo"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |
| G.08. | Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv |
| G.09. | <input type="text" value="Drugo"/> | <input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv |

Komentar

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2017, 2018 in 2019

C. Izjave



Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat, ki ga bomo posredovali v digitalni obliki ali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Potrjujemo zgoraj navedene izjave.

Podpisa:

Zastopnik oz. pooblaščenca oseba

in

Vodja programa/projekta

Breda Jakovac Strajn

Digitalno podpisano

Brigita Slavec

Digitalno podpisano

ŽIG

Datum: 10. 08. 2022

Oznaka obrazca: 3h6l-djbo-qxsi-l828-leed-epnw-q

INFLUENCA PRI PRAŠIČIH IN NAVODILA ZA ODVZEM VZORCEV ZA DOKAZ VIRUSA INFLUENCE TIPA A

asist. dr. Irena Golinar Oven, UL, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Irena.GolinarOven@vf.uni-lj.si, izr. prof. dr. Marina Štukelj, UL, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, marina.stukelj@vf.uni-lj.si, doc. dr. Brigita Slavec, UL, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Brigita.Slavac@vf.uni-lj.si

Uvod

Prašičja influenza (PI) je kužno virusno obolenje, ki ga povzročajo virusi influence tipa A, ki sodijo v družino *Orthomyxoviridae* (1). PI se je pri prašičih prvič pojavila leta 1918 v ZDA in je sovpadala s pandemijo influence pri ljudeh, ko je po svetu umrlo 20-50 milijonov ljudi. Zaradi kliničnih podobnosti z gripo pri ljudeh so bolezen pri prašičih poimenovali gripa (2).

O prašičji influenci govorimo, kadar opazimo več kliničnih primerov bolezni pri prašičih, ki imajo povišano telesno temperaturo, zmanjšan apetit, kašelj ali kihanje, oteženo dihanje, izcedek iz nosu in oči ter so se klinični znaki razvili v enem tednu in prizadeli vsaj 10 % živali v enoti (3).

Obstaja kar nekaj povzročiteljev respiratornih bolezni pri prašičih, ki povzročajo podobna klinična znamenja kot so pri PI, poleg tega pa so respiratorna obolenja v velikih čredah prašičev zelo pogosta. Poudariti je treba, da okužba z pandemičnim virusom H1N1/2009 (pH1N1/2009) pri prašičih ne povzroči vedno značilnih kliničnih znamenj, čeprav se okuži imunološko naivna čreda prašičev (3).

PI se pojavlja na vseh kontinentih, pogosta je v Evropi, Severni in Južni Ameriki, nekaterih delih Azije; o njej so poročali tudi v Afriki (3). Poleg ekonomskega pomena, ki ga ima pri prašičih, okužbe z virusom PI predstavljajo pomembno potencialno grožnjo javnemu zdravstvu. O zoonotičnih okužbah z virusi PI so poročali povsod po svetu, vključno s klasičnimi prašičjimi H1N1 virusi, kot tudi z aviarnimi linijami virusov in z virusi, ki so nastali s prerazporejanjem genskih segmentov med različnimi podtipi in genotipi (4, 5). Podatki o prenosu virusov prašičje influence s človeka na človeka so redki; za razliko od pandemije leta 2009-2010, ki jo je povzročil p H1N1/2009 (6).

Prašiči naj bi imeli pomembno vlogo kot vmesni gostitelji pri prerazporejanju genskih segmentov in/ali adaptaciji virusov influence A, ki bi lahko imeli pandemični potencial za ljudi (6). V zadnjih dveh desetletjih je bilo prerazporejanje genskih segmentov med humanimi, aviarnimi, in/ali prašičjimi virusi pri prašičih pogosto evidentirano, ni pa dokazano, da je do prerazporejanja prišlo ravno pri prašičih. Nazadnje je nastal leta 2009 pH1N1 kot rezultat prerazporejanja med virusi prašičje influence, ki zajemajo severnoameriške in evroazijske linije (7).

Gostitelj

Virusi influence tipa A se najpogosteje pojavljajo pri pticah, ljudeh, prašičih, konjih, psih in vodnih sesalcih (3, 6). Virus PI lahko poleg domačih prašičev in ljudi, okužijo tudi divje prašiče in v redkih primerih tudi vodno perutnino in purane (6, 8).

Med prašiči krožijo predvsem podtipi virusov H1N1, H1N2 in H3N2, ki pa se antigensko in genetsko razlikujejo med posameznimi kontinenti in geografskimi regijami (2, 9). Prašiči se lahko naravno in eksperimentalno okužijo z različnimi podtipi virusov aviarnе influence. Iz prašičev v Kanadi in Aziji so npr. izolirali aviarnе podtipe H1N1, H3N2, H3N3 in H4N6, iz

prašičev v Aziji pa H5N1 in H9N2, vendar se ti virusi ne zadržujejo v prašičji populaciji oz. so zelo omejeni pri njihovem razmnoževanju v prašičih in širjenju med prašiči. Da bi se virus adaptiral na prašiče oz. širil znotraj populacije prašičev, morajo virusi aviarne influence načeloma mutirati oz. mora priti do prerazporejanja genskih segmentov med aviarnimi in prašičjimi geni (6); izjemo predstavlja evropski aviarni prašičji H1N1, kjer se je celoten aviarni virus adaptiral na prašiče (10). Tudi viruse humane influence so občasno izolirali iz prašičev, zlasti humani virus H3N2 je bil pogosto ugotovljen pri prašičih v Aziji in občasno v Evropi in Severni Ameriki. Virusi H3N2, ki so se obdržali pri prašičih v Severni Ameriki in Evropi so nastali s prerazporejanjem tako humanih kot prašičjih genov (6).

Prenos

PI se v rejo zanese s premiki živali, npr. z nakupom živali ali z živalmi, ki so se vrnile s sejma (11). Najpogosteje se virus prenaša z neposrednim stikom med okuženo in dovzetno živaljo ali kapljično. Pri prašičih je najpogostejša nazofaringealna pot okužbe, najverjetneje preko nosnega kontakta. Virus se lahko začne izločati z nosnim izcedkom že v 24 urah po okužbi, običajno pa ga v nosnem izcedku ne zaznamo več 7 do 10 dni po okužbi (1).

Klinična slika

Akutni izbruhi s kliničnimi znamenji PI so večinoma omejeni na dovzetne, serološko negativne prašiče npr. odstavljeni pujski brez maternalnih protiteles ali pitanci (6).

Pri akutni obliki se po kratki inkubaciji (1-3 dni), pojavijo naslednja klinična znamenja: neješčnost, ležanje, gručenje, povišana telesna temperatura od 40,5°C do 41,7°C. Če so živali prisiljene v gibanje, se lahko pojavi abdominalno dihanje z odprtimi usti in napadi kašlja. Opazimo lahko vnetje očesnih veznic, nosni izcedek in kihanje. Obolenost je skoraj 100 %, smrtnost pa običajno ni višja od 1 %. Živali si večinoma opomorejo v 5 do 7 dneh po pojavu kliničnih znamenj, v kolikor ne pride do okužb s sekundarnimi povzročitelji (3, 6). Manj pogosta posredna posledica okužbe z virusom PI so lahko tudi abortusi pri svinjah (6).

V večini čred prašičev okužba z virusi influence A postane endemična in klinična slika se sčasoma spremeni, postane manj očitna ali celo poteka subklinično (3).

Ekonomske izgube zaradi okužbe z virusom PI so posledica predvsem slabših prirastov, daljšega piganja živali in dovzetnosti živali za sekundarne bakterijske okužbe (6).

Diferencialne diagnoze

Virus PI je le eden od povzročiteljev, ki povzroča respiratorna obolenja pri prašičih; pogosto sinergistično sodeluje z drugimi bakterijami in virusi pri nastanku prašičjega respiratornega bolezenskega kompleksa (PRDC). Dejstvo je, da sekundarne okužbe z bakterijami kot so *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* in *Streptococcus suis* tip 2, povečajo resnost in potek okužbe z virusom PI. Ostali respiratorni virusi, kot sta prašičji respiratorni koronavirus (PRCV) in virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRSV) pogosto okužita prašiče v enaki starosti kot virus PI. Med temi patogenimi povzročitelji, so PRRSV, *M. hyopneumoniae* in virus PI največkrat dokazani pri 10 do 22 tednov starih prašičih (1, 6).

Terapija

Specifičnega zdravljenja ni. Akutno obliko PI zdravimo z antibiotiki, da preprečimo sekundarne bakterijske okužbe in z antipiretiki, da skrajšamo obdobje neješčnosti in izgube teže. Zagotoviti moramo zadostno količino pitne vode in udobno okolje, s čim manj stresa (1, 12).

Odpornost virusa v okolju

Preživetje virusa v okolju je odvisno od temperature, pH, slanosti in prisotnosti organskega materiala. Kljub temu, da imajo virusi influence ovojnico, lahko preživijo dalj časa v okolju, predvsem pri nižjih temperaturah. Virusi influence pri sesalcih so relativno labilni, lahko pa preživijo nekaj ur v posušeni sluzi. Inaktiviramo jih lahko s segrevanjem pri 56° C najmanj 1 uro (ali pri višji temperaturi krajši čas), z ionizirajočo radiacijo ali nizkim pH (pH 2).

Virusi influence so občutljivi na različna razkužila: natrijev hipoklorit, 70 % etanol, oksidacijska sredstva, kvarterne amonijeve spojine, aldehidi (formalin, glutaraldehid, formaldehid), fenoli, kisline, povidon-jod in lipidna topila (1).

Preventiva

Najpomembnejši biovarnostni ukrepi, ki se uporabljajo pri preprečevanju in širjenju okužb z virusom PI so: karantena živali, ki na novo pridejo v rejo, omejitev obiska na farmi, preoblačenje in preobuvanje pred vstopom v hlev, sistem reje »vse noter-vse ven«, čiščenje in razkuževanje prostorov in orodja, ki se uporablja v reji, zmanjševanje prenaseljenosti hlevov, zmanjševanje količine prahu v reji (13), minimalno premikanje in mešanje živali, preprečevanje stikov z ostalimi vrstami živali, zlasti s perutnino in preprečevanje stikov z ljudmi, obolelimi za influenco. Ponekod v Evropi in ZDA uporabljajo preventivno intramuskularno vakcinacijo s komercialno inaktivirano vakcino. Večina vakcin vsebuje celoten virus. Primarno se živali vakcinirajo dvakrat z dva- do štiritedenskim razmakom. Za svinje so priporočljive pozitivne doze cepiva dvakrat letno. Z vakcinacijo svinj podaljšamo maternalno imunost pri pujskih (6). Vakcinacija pitancev se redkeje izvaja, jo pa priporočajo v tistih čredah, kjer PI predstavlja problem pri pitancih. V tem primeru je bolje, da se ne vakcinira svinj, da pasivna protitelesa ne motijo razvoj aktivne imunosti (14).

Laboratorijska diagnostika

Virus PI lahko dokažemo z izolacijo na celičnih kulturah ali na embrioniranih kokošjih jajcih, vedno bolj pa se uporablja molekularna diagnostika s katero ugotavljamo virusno RNK v vzorcu. Za dokazovanje virusa se lahko uporablja obratni prepis in konvencionalna verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) ali verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-qPCR). Kot vzorec se najbolj pogosto uporablja nosni bris, lahko pa virus potrdimo tudi v ustni tekočini in bronhio-alveolarnem izpirku (1, 6).

Posredno lahko okužbo ugotavljamo z dokazovanjem protiteles proti virusu influence. Običajno za dokaz protiteles uporabljamo serum. Protitelesa se v serumu lahko pojavijo že 7-10 dni po okužbi in so prisotna vsaj 6 – 8 tednov (15). Za potrditev okužbe se priporoča odvzem parnega seruma v razmaku 14 do 21 dni (1). Serološko testiranje pri PI nima velikega pomena, kadar je PI prisotna endemično in kjer prašiče vakcinirajo (9).

V prilogah so podana Navodila za odvzem vzorcev (priloga1) in Obrazec spremnega dopisa (priloga 2).

Stanje v Sloveniji

V letih od 2001 do 2003 smo na Veterinarski fakulteti, Kliniki za prežvekovalce in prašiče, na protitelesa proti virusu PI podtipa H1N1 in H3N2 preiskali 1005 serumov plemenskih svinj in 1004 serume pitancev iz osmih velikih farm. Pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca proti podtipu H1N1 povprečno 37 %, proti podtipu H3N2 pa 36 %. Pri pitancih je bila seroprevalenca proti podtipu H1N1 20 %, proti podtipu H3N2 pa 26 %. V letu 2006 smo preiskali 304 serume plemenskih svinj iz šestih velikih farm in 350 serumov pitancev iz sedmih velikih farm na protitelesa proti podtipu H1N1. Pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca 49,6 %, pri pitancih pa 47 % (8). Epidemiološka slika okužb prašičev z virusi influence A je v zadnjem

desetletju praktično nepoznana. Zaradi velikega pomena prašičev v ekologiji virusov influence je eden od ciljev raziskovalnega projekta z naslovom: **Detekcija virusov influence tipa A v okoljskih vzorcih, krmi in nastilju ter priprava algoritma za diagnostiko influence pri prašičih** ugotoviti, kateri virusi influence krožijo v populaciji prašičev v Sloveniji, kje in koliko časa se virusi na farmi zadržujejo in pripraviti protokole vzorčenja. V letu 2019 smo preliminarno preiskali 60 krvnih vzorcev plemenskih svinj, 60 krvnih vzorcev pitancev in 60 krvnih vzorcev devet tedenskih tekačev iz šestih konvencionalnih farm na protitelesa proti virusom influence A s testom ELISA za dokazovanje protiteles proti aviarni influenci pri več živalskih vrstah. Pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca 53,3 %, pri pitancih 43,3 % in pri tekačih 11,6 %.

PRILOGA 1

1. Navodila za odvzem vzorcev za dokaz virusa PI

Če želimo dokazati virus moramo vzorce odvzeti pri živalih, ki kažejo klinična znamenja bolezni (najboljše 24 do 48 ur po pojavu kliničnih znamenj) ali so jih pred kratkim. Na okuženem gospodarstvu vzorčimo do 20 bolnih živali, če je klinično prizadetih manj živali vzorčimo vse bolne živali (1, 3).

1.1. Odvzem nosnega brisa

Nosnih brisov od posameznih prašičev ne združujemo - v eno epruveto damo le en bris. Za jemanje nosnih brisov priporočamo uporabo sterilnih najlonskih ali poliestrskih (Dacron), lahko tudi bombažnih brisov. Držalo brisa naj bo dolgo vsaj 15 cm in plastično, če se da zelo upogljivo, da se ne zlomi zlahka. Priporočljiva je uporaba komercialnih brisov, ki imajo priloženo epruveto s transportnim medijem za viruse. Lahko se odvzame tudi suhe brise (16).

1. **Prašiča** pri jemanju nosnih brisov **fiksiramo** z zanko, tako da je glava nekoliko dvignjena, kar omogoči lažji dostop do nosnih votlin. Anestezija ni potrebna.

Nosnice morajo biti čiste, brez umazanije, blata ali delčkov krme (16).

2. **Vstavimo sterilen bris** v nosno votlino v dorzalno-medialni smeri (slika 1). Nežno s krožnimi gibi podrsamo po površini nosne sluznice, da zaobjamemo čim več nosne površine sluznice. To počnemo približno 5 sekund (oz. vsaj 5x bris za rotiramo), zato da se absorbira sluz in s tem pridobimo nosni izcedek in površinski epitelij.

Povprečna globina pri kateri vzamemo optimalni nosni bris:

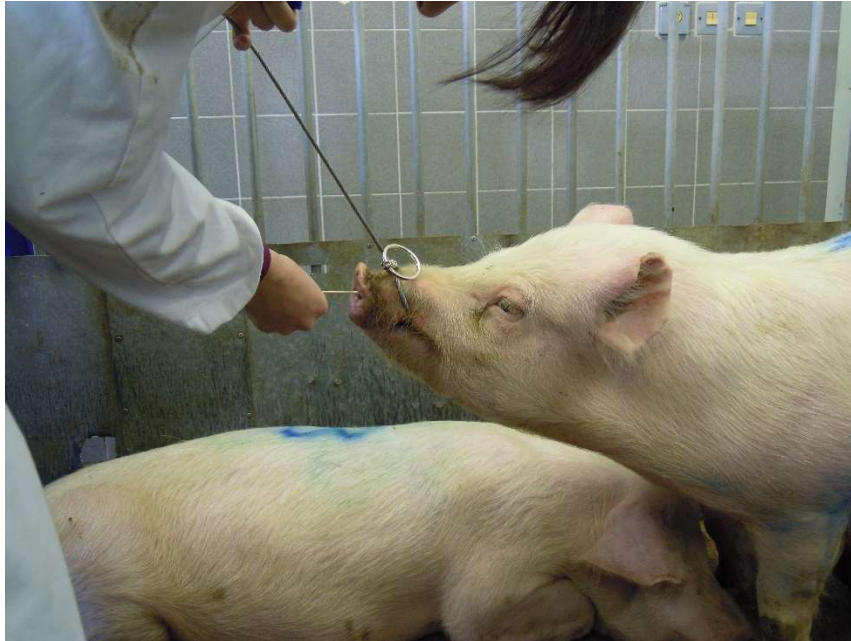
- 1 cm pri pujskih starih 0 do 4 tedne,
- 2 cm pri odstavljenih starih 4 - 7 tednov,
- 3 - 4 cm pri pitancih starih več kot 7 tednov.

Takšna globina je primerna kadar jemljemo vzorce pri bolnih prašičih z respiratornimi znamenji; če želimo virus izolirati pri prašičih brez kliničnih znamenj, je potrebno bris vzeti dvakrat globlje.

Pri jemanju brisa ne smemo biti pregrobi, saj kri na brisu ni zaželena.

Ko izvlečemo bris iz nosne votline, pazimo da se z brisom ne dotaknemo kože in drugih površin (16).

3. Z istim brisom ponovimo postopek še v drugi nosnici (16).



Slika 1: Fiksacija in odvzem nosnega brisa (Foto: Irena Golinar Oven)

4. Ko vzamemo nosni **bris**, ga damo v **plastično epruveto** s tekočim transportnim medijem (virusni transportni medij ali fosfatni pufer z NaCl (PBS)). Lahko uporabimo tudi suhe brise.

Če se uporablja transportni medij, ga mora biti toliko, da prekrije glavo brisa.

V kolikor je ročaj brisa predolg, izvlečemo bris nekoliko iz epruvete in upognemo držalo brisa naprej in nazaj čez rob epruvete, dokler se ne prelomi oziroma držalo odrežemo, vendar moramo paziti, da se izognemo kontaminaciji vzorca z neprimerno razkuženim orodjem (16).

5. **Epruveta mora biti tesno zaprta, da se vsebina ne razlije, in označena tako, da je zagotovljena sledljivost. Zelo je pomembno, da je vzorec med transportom ves čas na hladnem (cca 4° C, v hladilni torbi). Izogibati se je treba zamrzovanju-odmrzovanju preden vzorec prispe v laboratorij (16).**
6. Ohlajen vzorec je potrebno poslati v laboratorij znotraj 48 ur (6).

1.1.1. Velikost vzorca za dokaz virusa PI pri odvzemu nosnih brisov

- a) Priporočeno je, da se **na farmah** z več kot dvajsetimi prašiči, **kjer se pojavljajo klinična znamenja**, odvzame vzorce 20. živalim z izraženimi kliničnimi znaki. Če je število prašičev v enoti manjše od 20, vzamemo vzorce vsem živalim.
- b) **Pri nedavno okuženih farmah**, število vzorcev lahko določimo s pomočjo tabele 1 pri 5 % prevalenci in 95 % meji zaupanja (3).

Tabela 1. Velikost vzorca za različno velike skupine, glede na % prevalenco in mejo zaupanja (3)

a) 5 % prevalenca, 95 % meja zaupanja

| | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| Velikost skupina | ≥ 2000 | 1000 | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 50 | 25 |
| Velikost vzorca | 59 | 56 | 53 | 52 | 50 | 46 | 38 | 28 | 18 |

1.2. Odvzem ustne tekočine

Ustna tekočina običajno predstavlja skupinski vzorec živali v boks in je primerna za ugotavljanje prisotnosti virusa v čredi, v njej lahko ugotavljamo tudi protitelesa proti virusu PI.

- Za jemanje ustne tekočine potrebujemo bombažno nebeljeno vrv, premera najmanj 1,27 cm oz. 1 cm za tekače in 2 cm za pitance.
- Ena vrv zadostuje za 10 - 15 živali.
- Konec vrvi obesimo v višini plečke prašiča za približno 20 - 30 minut; če prašiči niso aktivni, lahko visi tudi 1 uro. Vrvi ne obešamo v bližini napajalnika, ker lahko voda razredči vzorec. Prav tako ne nad krmilniki, saj s tem zmanjšamo interes prašičev za žvečenje vrvi. Pri mokrem krmljenju je priporočljivo vzorce vzeti pred krmljenjem ali vsaj 2 uri po krmljenju, sicer bodo prašiči neaktivni. Za spodbujanje žvečenja se lahko uporabljajo tudi atraktanti, npr. 5 % sterilna raztopina glukoze.
- Ustno tekočino dobimo s stiskanjem vrvi v plastični vrečki. Na tržišču se dobijo vrečke z vijalko, kamor steče ustna tekočina, drugače pa s škarjami odrežemo rob vrečke, še prej pa podstavimo vijalko. Vijalko označimo, napišemo spremni dopis in pri 4° C pošljemo v laboratorij (17,18).

2. Odvzem vzorcev za dokaz protiteles proti virusu PI

2.1. Odvzem seruma

Kri vzamemo iz v. cavae cranialis ali v. jugularis, pri čemer potrebujemo epruvete za serum.

1. fiksacija:

- do 40 kg lahko uporabimo korito ali desko; žival položimo na hrbet, potrebujemo pomočnike za fiksacijo glave in nog.
- nad 40 kg uporabimo zanko, vrat mora biti stegnjen navzgor.

2. odvzem iz v. cave cranialis (slika 2)

- dolžina igle: 1cm/10 kg; do 50 kg 5 cm, nad 50 kg 10 cm, nad 100 kg 14 do 20 cm.
- vbodno mesto: fossa jugularis (2-3 cm pred manubrium sterni lateralno; pri majhnih pujskih 1 cm kranialno in lateralno od kranialnega roba prsnice), desna stran.
- smer: kavdomediodorzalno - proti vihru (19).



Slika 2: Odvzem krvi iz v. cavae cranialis (Foto: Marina Štukelj)

3. odvzem iz v. jugularis

- igla je usmerjena kaudodorzalno, pravokotno na kožo.
- mesto jemanja krvi: najgloblja točka jugularnega žleba med medialnimi sternocephalnimi in lateralnimi brachiocephalnimi mišicami.
- možno jemanje krvi pri vseh kategorijah (19).

4. Vsako **eproveto** s krvjo ustrezno **označimo** in priložimo **spremní dopis**.

Kri pustimo koagulirati na sobni temperaturi. Koagulacija in retrakcija koaguluma nastane po 2 - 4 urah. Koagulirane vzorce hranimo pri 2 -8 ° C in jih pošljemo v laboratorij znotraj 72. ur. Če to ni mogoče, potem je potrebno serume odliti in vzorce zamrzniti. Zamrznjeni vzorci serumov lahko pridejo v laboratorij v nekaj mesecih. Minimalna količina seruma je 0,5 ml.

2.1. Velikost vzorca krvi za dokaz protiteles proti virusu PI

Glede na to, da smo pri prašičji influenci v Sloveniji pri plemenskih svinjah ugotovili seroprevalenco 53,3 %, pri pitancih 43,3 % in pri tekačih 11,6 %, se za testiranje odvzame 4 vzorce v čredah do 30 plemenskih svinj, 5 vzorcev v čredah z več kot 50 plemenskimi svinjami, ne glede na število odvzamemo 6 vzorcev pri pitancih in 19 do 29 pri tekačih.

PRILOGA 2

Spremni dopis za pošiljanje vzorcev – prašičja influenza (PI)

Kontaktne podatki vzorčevalca

Ime:

Naslov:

Telefon (če je na voljo):.....

Elektronski naslov (če je na voljo):

Tip in število vzorcev:

X bris..... X serum..... X drugo.....

Podatki o gospodarstvu

1. Ime lastnika oz. farme:.....

2. Naslov farme:.....

3. Občina / Območni urad UVHVVR:.....

4. Tip reje (obkroži):

X velika komercialna farma (nad 800 pl. svinj)

X srednja komercialna farma (100-800 pl. svinj)

X mala komercialna farma (do 100 pl. svinj)

X pitovna farma

X nekomercialna reja

X farma z izpustom

X farma brez izpusta

5. Skupno število živali prisotnih na farmi:

sesni pujski....., odstavljeni....., pitanci....., plemenske svinje....., merjasci.....

6. Namen preiskave je:

X klinična slika pri prašičih

X potrjene okužbe pri ljudeh

7. Kratka anamneza z opisom klinične slike pri živali

.....
.....
.....

Datum odvzema vzorcev:.....Podpis vzorčevalca:.....

Literatura

1. OIE. Swine influenza, 2009.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_INFLUENZA.pdf (4.11.2019)
2. Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine influenza. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 2006: 469-82.
3. Dauphin G, Dietze K, Domenech J, et al. FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations. Rome: food and agriculture organization of the united nations, March 2010. <http://www.fao.org/3/a-ak738e.pdf> (4. 11. 2019)
4. Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J, et al. Human Case of Swine Influenza A (H1N1) Triple Reassortant Virus Infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(9): 1470-2.
5. Ma W, Kahn RE, Richt JA. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med* 2009; 3(1): 158-66.
6. Van Reeth K, Brown IH, Olsen CW. Influenza virus. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevensen GW, eds. Diseases of swine. 10th ed. Chichester : John Wiley & Sons, 2012: 557-70.
7. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459(7250): 1122-5.
8. Golinar Oven I. Razširjenost prašičje influence na velikih farmah prašičev v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2007. Magistrsko delo.
9. OFFLU Strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals. Maj 2013.
<http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf> (8. 11. 2019)
10. Van Reeth K, Brown IH, Dürrwald R, et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respir Viruses* 2008; 2(3): 99-105.
11. Brown IH. The molecular epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. In: Proceedings of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease, 2003. Rome, 2003: 245-9.
12. Sibbel R. Keeping up with swine influenza. *Pig Int* 2000; 30(6): 24-6.
13. Done SH. Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Pig J* 2002; 50: 174-96.
14. Straw B. Update on swine influenza. *Envoy* 2000; 8(4): 1-3.
15. Heinen PP, van Nieuwstadt AP, Plo JM, de Boer-Luijtz EA, van Oirschot JT, Bianchi AT. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol* 2000; 13: 237-47.
16. OFFLU swine influenza virus technical working group. Collection of specimens from swine for the detection of influenza A virus by molecular assays or virus isolation, 2017. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/OFFLU-Collection_of_Specimens_for_Detection_of_Influenza_December2017.pdf (4. 11. 2019)
17. Detmer SE, Patnayak DP, Jiang Y, Gramer MR, Goyal SM. Detection of influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23: 241-7.
18. Iowa State University. College of Veterinary Medicine, Veterinary diagnostic and production animal medicine. Oral fluid, 2019.
<https://vetmed.iastate.edu/vdpam/research/disease-topics/swine/oral-fluids> (4. 11. 2019)

19. Dewey CE, Straw BE. Herd examination. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 2006: 12-3.
20. Cannon RM, Roe RT. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Canberra: Australian Bureau of Animal Health, 1982: 16.