

SVUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Sofija Džakula

**Utvrđivanje prisutnosti i proširenosti rotavirusa A u ljudi i različitim
vrsta domaćih životinja na jednom obiteljskom gospodarstvu**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu i na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentori: Doc. dr. sc. Josipa Habuš

Dr. sc. Dragan Brnić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Zoran Milas
2. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
3. Doc. dr. sc. Josipa Habuš
4. Dr. sc. Matko Perharić – zamjena

Izrada ovog diplomskog rada ostvarena je u okviru provedbe Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-UIP-2017-05-8580 „Rotavirusi u ekosustavu Republike Hrvatske:molekularna epidemiologija i zoonotski potencijal“.

Zahvaljujem mentorima doc. dr. sc. Josipi Habuš i dr. sc. Draganu Brniću na pruženoj podršci, savjetima, izdvojenom vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog rada te na stručnom i profesionalnom vodstvu.

Zahvaljujem Ivani Šimić, dr.med.vet i Alenu Kovačeviću, mag.biol.mol. na pomoći oko izvođenja praktičnog dijela rada te na stručnim savjetima i ljubaznom odnosu.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama s fakulteta zbog kojih je studiranje bilo ljepše i zabavnije.

I na kraju, veliko hvala cijeloj mojoj obitelji, koja je uvijek bila najveća podrška.

Sadržaj

Popis slika.....	IV
Popis tablica.....	V
Popis kratica	VI
1.UVOD.....	1
2.PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1.Etiologija.....	2
2.2. Epizootiologija	3
2.3. Patogeneza.....	5
2.4. Klinička slika	6
2.4.1. Klinička slika kod teladi.....	6
2.4.2. Klinička slika kod prasadi	6
2.4.3. Klinička slika kod ždrebad.....	7
2.4.4. Klinička slika kod janjadi i jaradi.....	7
2.4.5. Klinička slika kod pasa.....	7
2.4.5. Klinička slika kod mačaka	7
2.5. Dijagnostika	8
2.6. Liječenje.....	9
2.7. Profilaksa.....	10
2.8. Javno zdravstvo	10
3.MATERIJAL I METODE	12
3.1. Prikupljanje uzoraka.....	12
3.1.1. Uzorci fecesa.....	13
3.1.2. Uzorci vode	19
3.2. Priprema uzoraka.....	20
3.2.1. Priprema uzoraka fecesa.....	20
3.2.2. Priprema uzoraka vode	20
3.3.Izdvajanje nukleinskih kiselina	21
3.3.1. Postupak izdavanja nukleinskih kiselina.....	22
3.4. Dokazivanje rotavirusa A metodom RT-PCR u stvarnom vremenu	24
3.5.Dokazivanje mengovirusa metodom RT-PCR u stvarnom vremenu.....	26
4.REZULTATI	29
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČCI	39
7.LITERATURA	40
8.SAŽETAK.....	45
9.SUMMARY	46
10.ŽIVOTOPIS.....	47

Popis slika

Slika 1. a) Prikaz rotavirusa elektronskim mikroskopom; b) Shematski prikaz rotavirusne čestice u presjeku.

Slika 2. Shematski prikaz preslagivanja genetskog materijala kod koinfekcije.

Slika 3. Položaj OPG-a Džakula u Sisačko-moslavačkoj županiji.

Slika 4. Postupak uzorkovanja fecesa i vode.

Slika 5. Sustav za filtraciju vode

Slika 6. KingFisher Flex uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina i uređaj RotorGene Q za izvođenje metode RT-PCR u stvarnom vremenu.

Slika 7. Shematski prikaz izdvajanja RNA i DNA.

Slika 8. Broj pozitivnih uzoraka po različitim vrstama životinja

Slika 9. Broj pozitivnih uzoraka kod teladi u predtovu po dobnim kategorijama

Slika 10. Odnos dobi i Ct vrijednosti kod pozitivnih uzoraka od teladi u predtovu

Slika 11. Broj pozitivnih uzoraka po različitim dobnim kategorijama svinja

Popis tablica

Tablica 1. Prikupljeni uzorci fecesa životinja.

Tablica 2. Uzorci prikupljeni od ljudi.

Tablica 3. Smjesa za denaturaciju rotavirusne RNA

Tablica 4. Početnice i proba korišteni u denaturacijskoj i reakcijskoj smjesi za dokazivanje rotavirusa metodom RT-PCR u stvarnom vremenu

Tablica 5. Reakcijska smjesa za RT-PCR u stvarnom vremenu za dokazivanje rotavirusa A

Tablica 6. Početnice i proba za dokazivanje mengovirusa

Tablica 7. Reakcijska smjesa za RT-PCR u stvarnom vremenu za dokazivanje mengovirusa

Tablica 8. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za telad u predtovu

Tablica 9. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za goveda u pašnom sustavu

Tablica 10. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za svinje

Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

E. coli – Escherichia coli

ELISA – imunoenzimni test (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

NSP – nestrukturni protein (engl. *Non-structural protein*)

OPG – obiteljsko poljoprivredno gospodarstvo

PAGE – elektroforeza na poliakrilamid gelu (engl. *Polyacrylamide gel electrophoresis*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic acid*)

RT-PCR - lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

RVA – rotavirus A

VP– virusni protein (engl. *Viral protein*)

1. UVOD

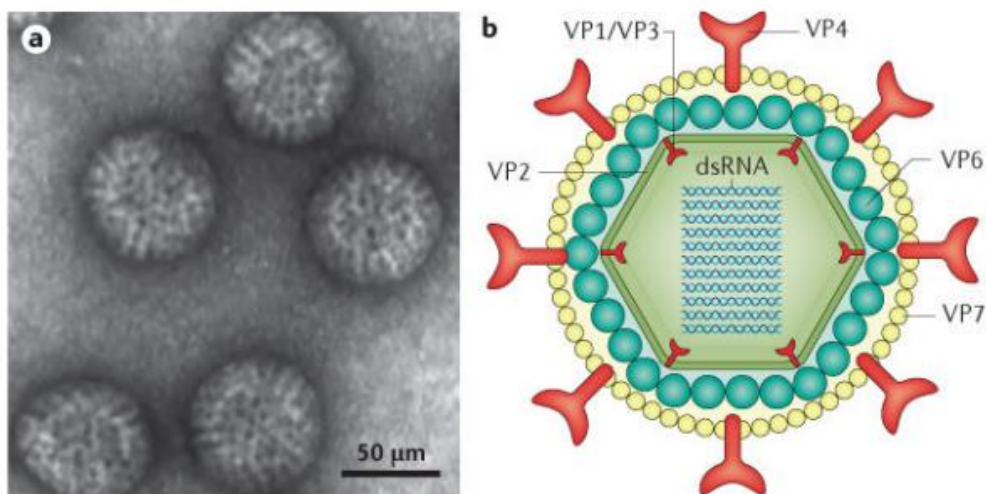
Rotavirusi, a posebno vrsta Rotavirus A (RVA), široko su rasprostranjeni uzročnici crijevnih infekcija. Iako se javljaju u različitim vrsta sisavaca i ptica, najznačajniji problem predstavljaju u intenzivnom uzgoju mlađih dobnih kategorija goveda i svinja, a primarni su uzrok i akutnog proljeva u djece do pet godina starosti. Rotavirusi pripadaju porodici virusa s dvolančanim i segmentiranim RNA genomom (*Reoviridae*) s učestalom pojavom križanja humanih i životinjskih sojeva. Iznimno su stabilni u okolišu što olakšava njihov prijenos između potencijalnih domaćina. Značajan nedostatak u razumijevanju epidemiologije rotavirusnih infekcija predstavlja činjenica da istraživanja životinjskih rotavirusa značajno zaostaju za istraživanjima humanih rotavirusa. Smatra se da bi dodatna istraživanja i stalni nadzor životinjskih sojeva rotavirusa uvelike pridonijeli razumijevanju životinjskih rezervoara koji u budućnosti mogu biti odgovorni za unos novih rotavirusa u ljudsku populaciju ili rotavirusnih gena u genetsku osnovu humanih sojeva.

Tijekom ovog istraživanja pretraženo je 117 uzoraka fecesa prikupljenih od goveda, ovaca, svinja, konja, magaraca, pasa, mačaka te ljudi koji borave na istom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu na području Sisačko-moslavačke županije. Uzorkovana su i tri uzorka površinskih voda koja služe kao pojilišta životinjama na gospodarstvu. Od uzoraka fecesa pripravljena je suspenzija u mediju za kulturu stanica, a uzorci površinske vode podvrgnuti su postupku membranske filtracije sa svrhom koncentracije virusnih čestica. Potom je uslijedio postupak izdvajanja RNA te postupak utvrđivanja prisutnosti rotavirusa A metodom RT-PCR u stvarnom vremenu koja omogućuje dokazivanje specifičnog odsječka VP2 strukturnog genomskog segmenta. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost i proširenost RVA u različitim vrsta životinja, ljudi i okolišu na jednoj mikrolokaciji, u sklopu obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva, u Sisačko-moslavačkoj županiji.

2.PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1.Etiologija

Rotavirusi pripadaju porodici *Reoviridae*, rodu *Rotavirus*. To su neobavijeni virusi koji posjeduju troslojnu ikozaedarsku proteinsku kapsidu, a svojim izgledom podsjećaju na kotač (Slika 1.). Genom virusa čini dvolančana RNA, podijeljena na 11 segmenata koji kodiraju 12 proteina; šest strukturnih (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) i šest nestrukturnih proteina (NSP1-NSP6) koji nastaju samo unutar inficirane stanice (MATTHIJNSSENS i sur., 2009; DESSELBERGER, 2014).



Slika 1. a) Prikaz rotavirusa elektronskim mikroskopom; b) Shematski prikaz rotavirusne čestice u presjeku (preuzeto i prilagođeno iz CRAWFORD i sur., 2018)

Temeljem razlika unutar segmenta RNA koji kodira protein VP6, rotavirusi su podijeljeni u devet vrsta (*Rotavirus A* do *Rotavirus I*) (ANOMYMOUS, 2019a) te moguće novu vrstu *Rotavirus J* (BÁNYAI i sur., 2017) koja je u postupku ishodaenja statusa. *Rotavirus A* (RVA) najčešći je uzročnik crijevnih infekcija kod ljudi, ali i svinja, preživača, konja, pasa, mačaka i peradi. *Rotavirus B* i *Rotavirus C* su također dokazani kod gore navedenih vrsta, ali znatno rjeđe (RADOSTITS i sur., 2007). Daljnja klasifikacija rotavirusa unutar vrsta temelji se na dva vanjska proteina (binarna klasifikacija), VP7 (genotip G) i VP4 (genotip P) koji izazivaju stvaranje neutralizacijskih protutijela. Ranije se ova klasifikacija temeljila na serotipizaciji, no s obzirom na to da je ona zahtjevna i neprimjenjiva u nekim laboratorijima, nadopunjena je i zamijenjena

genotipizacijom (MATTHIJNSSENS i sur., 2009). Do sada je poznato ukupno 36 genotipova G i 51 genotip P (ANONYMOUS, 2019b).

Rotavirusi su vrlo otporni i dugo preživljavaju u fecesu. Odgovara im relativno širok spektar relativne vlažnosti zraka, kao i pH u rasponu 3-9, te niže temperature zraka. Dezinficijensi poput etera, kloroforma, natrijeva hipoklorita i kvarternih amonijevih spojeva ih ne uništavaju, ali osjetljivi su na etanol, fenol, formalin i lizol (CVETNIĆ, 1997).

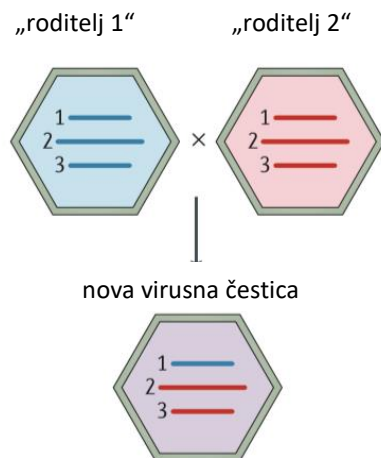
2.2. Epizootologija

Rotavirusi su vrlo prošireni uzročnici proljeva u raznih vrsta domaćih životinja. Glavni izvor infekcije su bolesne životinje i životinje kliconoše koje fecesom izlučuju velike količine uzročnika (RADOSTITS i sur., 2007). Primjerice, telad već drugi dan od infekcije počinje fecesom izlučivati uzročnika, a izlučivanje se nastavlja i nakon prestanka kliničkih simptoma (DHAMA i sur., 2009). Iako odrasle životinje rijetko obolijevaju, one mogu biti asimptomatski inficirane te izlučivati virus fecesom. Virus se širi fekalno-oralnim putem, direktnim kontaktom ili posredno preko kontaminirane hrane, vode, prostora, površina ili predmeta. Rotaviruse smatramo vrlo kontagioznima, s obzirom na to da su relativno otporni na uobičajene dezinficijense i okolišne uvjete, oboljele životinje izlučuju velik broj uzročnika, a infektivna doza je niska, primjerice KIULIA i sur., 2014 navode da je ID₅₀ svega 6 virusnih čestica.

Rotavirus A (RVA), koji je najčešće dokazan kod domaćih životinja, ima ukupnu prevalenciju 30% kod zdravih mladih životinja, a 40% kod životinja s proljevom. Primjerice kod teladi, prevalencija infekcije se kreće u rasponu 16-80%, ali rijetko sve inficirane životinje razviju kliničku sliku. U nekim uzgojima zabilježeno je da u prvoj godini oboli 5-10% primljivih životinja, u drugoj 20-50%, a u trećoj 50-80%, dok su drugdje zabilježena nagla i masovna obolijevanja i do 80% teladi već pri prvoj pojavi bolesti. Letalitet također može znatno varirati, pa tako za telad iznosi 5-60% (RADOSTITS i sur., 2007).

Na pojavu i tijek infekcije utječu brojni čimbenici kao što je unos kolostruma, dob i zdravstveno stanje životinje, imunostatus majke, virulencija uzročnika, prisutnost drugih patogena te okolišni uvjeti (DHAMA i sur., 2009). Zaštita mladunčadi od rotavirusne infekcije u prvim danima ovisi o kolostralnim protutijelima, a sam zaštitni učinak kolostruma ovisi o titru protutijela, količini koju je novorođenče dobilo te o dostupnosti u lumenu crijeva (RADOSTITS i sur., 2007).

Epizootiologija rotavirusnih infekcija vrlo je složena zbog postojanja i istovremenog cirkuliranja velikog broja različitih sojeva virusa te zbog vrlo čestih mutacija i preslagivanja genetskog materijala (DHAMA i sur., 2009). Naime, kod rotavirusa su vrlo učestale točkaste mutacije. BLACKHALL i sur., 1996 navode kako u svakom ciklusu replikacije dolazi do promjene jednog nukleotida, a za pojavu je odgovorna pogreškama sklona rotavirusna RNA polimeraza (RdRp) (DESSELBERGER, 2014). S obzirom na to da virusni proteini VP4 i VP7 dolaze u interakciju s protutijelima, događa se da promjene u njihovoj strukturi, koje su posljedica točkastih mutacija, rezultiraju sposobnošću virusa da izbjegne imunosti odgovor domaćina. Također, prilikom istovremene infekcije neke stanice s dva ili više različitih sojeva rotavirusa, dolazi do kombinacije njihovog genetskog materijala i nastanka novih virusnih čestica (Slika 2), genetski različitih od onih koje su prvotno inficirale stanicu jer sadrže segmente genoma od više „roditeljskih“ sojeva (THEUNS, 2015). Mogućnost preslagivanja genetskog materijala tijekom koinfekcije različitim sojevima posljedica je postojanja segmentiranog genoma pa tako tu pojavu nalazimo i kod primjerice virusa influence iz porodice *Orthomyxoviridae*. Ova pojava je vrlo značajna jer doprinosi razvoju patogenosti i zoonotskog potencijala rotavirusa. (MCDONALD i sur., 2016).



Slika 2. Shematski prikaz preslagivanja genetskog materijala kod koinfekcije (preuzeto iz McDONALD i sur., 2016)

Važno je napomenuti da su rotavirusi u velikom broju slučajeva prisutni istovremeno s nekim drugim crijevnim patogenom. Primjerice, kod teladi se najčešće radi o istovremenoj infekciji s koronavirusom, bakterijom *Escherichia coli* (*E. coli*), bakterijama iz roda *Salmonella*

i/ili o infestaciji s protozonarnim parazitom roda *Cryptosporidium* (RADOSTITS i sur., 2007). Nadalje, zabilježeno je da zimski uvjeti držanja, dakle niske temperature, veća gustoća naseljenosti objekata i slabiji zoohigijenski uvjeti znatno pridonose pojavi i širenju bolesti. (DHAMA i sur., 2009).

Prijenos rotavirusa između vrsta je moguć, bilo da se radi o prijenosu između životinjskih vrsta ili između ljudi i životinja. Iako su slučajevi prijenosa između vrsta relativno rijetki, njihov je značaj velik jer otvara mogućnost za križanje humanih i životinjskih sojeva virusa (THEUNS, 2015).

2.3. Patogeneza

Patogeneza rotavirusne infekcije slična je kod različitih vrsta domaćih životinja. Nakon peroralnog unosa, rotavirusi inficiraju zrele enterocite tankog crijeva. Prve su na udaru epitelne stanice duodenuma, u kojima dolazi do umnažanja virusa i nastanka velikog broja virusnih čestica koje onda inficiraju enterocite distalnijih dijelova tankog crijeva (DHAMA i sur., 2009).

Kako bi ušli u stanicu, rotavirusi se moraju osloboditi vanjskog sloja kapside pri čemu važnu ulogu ima tripsin koji se fiziološki nalazi u crijevima. Nakon ulaska, u citoplazmi stanice dolazi do aktivacije RNA polimeraze (VP1), transkripcije i nastanka mRNA molekula koje služe kao kalup za sintezu virusnih proteina, strukturnih i nestrukturnih. Kada se stvori dovoljno virusnih proteina, replicira se RNA te se formiraju nove virusne čestice koje nakon lize stanice dopijevaju u lumen crijeva (DESSELBERGER, 2014).

Propale zrele enterocite zamjenjuju nezrele stanice iz kripti koje nemaju sposobnost apsorpcije, transporta glukoze i natrija te lučenja laktaze. Posljedično dolazi do gubitka bikarbonata, natrija, kalija, klora i vode te razvoja acidoze. Osmotska ravnoteža u lumenu crijeva dodatno se narušava i zbog velikih količina laktoze koja se ne probavlja zbog manjka laktaze. Opisana malapsorpcija jedan je od nekoliko mehanizama u patogenezi rotavirusne infekcije. Naime, zbog lize velikog broja stanica dolazi do oslobađanja različitih vazoaktivnih tvari te do aktivacije crijevnog živčanog sustava i posljedično hipermotiliteta crijeva. Također, važan čimbenik kod nastanka proljeva pri rotavirusnoj infekciji jest virusni enterotoksin, protein NSP4 koji dopijeva u lumen crijeva nakon lize inficiranih stanica, veže se na susjedne stanice i remeti resorpciju iona (THEUNS, 2015). Rotavirusi prelaze crijevnu barijeru i uzrokuju viremiju i

antigenemiju, ali su mehanizmi infekcije izvan želučano-crijevnog sustava i dalje nepoznati (CRAWFORD i sur., 2018).

2.4. Klinička slika

Rotavirusi uzrokuju klinički manifestnu infekciju uglavnom kod mladih životinja, dok su odrasle životinje često subklinički inficirane i tako predstavljaju važan izvor infekcije. Klinička slika je slična kod svih vrsta domaćih životinja i obuhvaća različite kliničke znakove koji su posljedica upale tankog crijeva. Ipak, kod teladi, prasadi i ždrebadi češće dolazi do razvoja težih kliničkih oblika te su i smrtni ishodi češći nego kod drugih vrsta (RADOSTITS i sur., 2007). Rotavirusi prelaze crijevnu barijeru pa možemo govoriti i o sistemske bolesti, a dosadašnja istraživanja u humanoj medicini upućuju na značaj kod neuroloških i autoimunih bolesti djece (GOMEZ-RIAL i sur., 2019), dok su kod životinja rotavirusi navedeni kao mogući uzročnici encefalitisa (BUSI i sur., 2017).

2.4.1. Klinička slika kod teladi

Proljev uzrokovan rotavirusom javlja se uglavnom kod teladi u dobi od pet do sedam dana. Klinički manifestni oblici bolesti mogu se javiti sve do trećeg mjeseca starosti, no nakon toga vrlo rijetko. Inkubacija je kratka i prvi se simptomi pojavljuju već 12-24 sata nakon infekcije, odnosno u nekim slučajevima 18-96 sati (DHAMA i sur., 2009). Bolest započinje naglim nastupom vodenastog, bijelog do žutog proljeva koji može sadržavati tragove krvi ili komadiće nalik ugrušanom mlijeku. Zbog obilnog i vodenastog proljeva, razvija se dehidracija različitog stupnja; telad je potištena i nevoljko se kreće, prestaju sisati, ekstremiteti su hladni, a očne jabučice upale (CVETNIĆ, 1997). Prema većini izvora, mortalitet kod novorođene teladi s rotavirusnim proljevom iznosi 5-20%, ali može biti i do 80% (DHAMA i sur., 2009).

2.4.2. Klinička slika kod prasadi

Najčešće obolijeva prasad starosti od 1-4 tjedna (DHAMA i sur., 2009), a prema nekim autorima, rotavirus se pojavljuje i kod prasadi do osmog tjedna starosti (MARTELLA i sur., 2010). Inkubacija traje 16-36 sati, nakon čega prasad postaje potištena i prestaje jesti. Proljev koji se javlja je vodenast, najčešće žutosmeđe boje. Jaka dehidracija i ugibanje mogući su kod najmlađe prasadi,

no većina životinja se kroz nekoliko dana oporavi. Letalitet kod najmlađe prasadi iznosi 7-20%. Pogoršanja kliničke slike često su vezana uz sekundarne infekcije bakterijom *E. coli* (CVETNIĆ, 1997).

2.4.3. Klinička slika kod ždrebadi

Infekcije rotavirusom javljaju se kod ždrebadi u dobi do dva mjeseca. Oboljela ždrebada je potištena, leži i ne sisa. Proljev je vodenast, sivozelene do žute boje. Kod nekih životinja prisutna je i povišena tjelesna temperatura. Ždrebada mlađa od dva tjedna može uginuti zbog dehidracije i poremećaja elektrolita već u prvih 24 sata, dok je kod starije ždrebadi izmet polutekuće konzistencije često jedini znak bolesti. Uz rehidraciju i potpurnu terapiju, oporavak nastupa za dva do četiri dana (RADOSTITS i sur., 2007).

2.4.4. Klinička slika kod janjadi i jaradi

Rotavirusne infekcije kod malih preživaca rjeđe su u odnosu na ranije navedene vrste. Također, kod janjadi i jaradi češći je nalaz rotavirusa B i C nego li rotavirusa A. Rotavirusi generalno kod janjadi i jaradi uzrokuju vodenasti bijeli do žuti proljev te životinje postaju potištene i dehidrirane. Najčešće se proljev javlja kod životinja između dva i 14 dana starosti, a rjeđe kod nešto starijih (PAPP i sur., 2014).

2.4.5. Klinička slika kod pasa

Rotavirusne infekcije javljaju se kod pasa različite starosti, no najčešće kod štenadi mlađe od dva mjeseca. Enteritis uzrokovan rotavirusima klinički se manifestira u blažem obliku u odnosu na parvovirusni ili koronavirusni. Uobičajena je pojava vodenastog do sluzavog proljeva koji traje osam do 10 dana, a psi uglavnom nemaju temperaturu. Pojedini slučajevi težeg rotavirusnog enteritisa sa smrtnim ishodom zabilježeni su kod štenadi mlađe od dva tjedna (GREENE, 2012).

2.4.5. Klinička slika kod mačaka

Kod mačaka su klinički vidljive rotavirusne infekcije vrlo rijetke, javljaju se uglavnom kod mlađih životinja, a kod starijih u slučaju imunosupresije. Simptomi su slični kao kod drugih crijevnih

infekcija, a uključuju vodenast proljev i izostanak apetita, a u nekim slučajevima i mučninu, povraćanje te blago povišenu temperaturu (GREENE, 2012).

2.5. Dijagnostika

Dijagnostika rotavirusnih infekcija provodi se na uzorcima fecesa ili sluznice crijeva. Za dokazivanje rotavirusa najčešće se koriste metoda lančane reakcije polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR), imunoenzimni test (ELISA) i elektronska mikroskopija (EM) (DESSELBERGER, 2014). U humano, ali i veterinarskoj medicini u upotrebi su često i imunokromatografski brzi testovi (THEUNS, 2015).

ELISA ima široku upotrebu zbog jednostavnosti i brzine izvođenja, dok RT-PCR ima veću osjetljivost i specifičnost što se posebno odnosi na RT-PCR u stvarnom vremenu (engl. real-time RT-PCR). Također, konvencionalni RT-PCR ima velik značaj u genotipizaciji rotavirusa, izravno nakon sekvenciranja umnoženih i pročišćenih RT-PCR produkata, ali i u genotipizaciji primjenom multipleks PCR reakcije (ANONYMOUS, 2019c). Iz navedenih razloga metoda RT-PCR smatra se „zlatnim standardom“ dijagnostike rotavirusa (DESELLBERGER, 2014) te je detaljnije opisana u daljnjem tekstu.

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction – PCR) u osnovi je metoda kojom se određeni, kratki dio DNA molekule umnaža u veliki broj kopija čiji nastanak je moguće detektirati i na taj način dokazati prisustvo specifičnog odsječka DNA u ispitivanom uzorku.

Kada, kao kod rotavirusa, genom čini RNA molekula, koristi se metoda RT-PCR. Naime, RNA se ne može izravno umnažati pomoću DNA polimeraze pa umnažanju mora prethoditi prepisivanje u komplementarnu DNA molekulu, pomoću enzima reverzna transkriptaza. Nakon prepisivanja, odnosno reverzne transkripcije, slijedi već opisani postupak umnažanja željenog dijela DNA molekule.

Nadalje, kod konvencionalnog PCR-a, potrebno je na kraju provesti i elektroforezu na agaroznom gelu kako bi se mogli vizualizirati rezultati provedene reakcije. Kod metode RT-PCR u stvarnom vremenu, nastanak umnoženih fragmenata moguće je pratiti dok reakcija još traje, dakle „u stvarnom vremenu“, preko mjerenja fluorescencije koja je proporcionalna količini nastalih DNA fragmenata, a završni rezultat očitati na računalu uređaja.

2.6. Liječenje

Terapija rotavirusnih infekcija nespecifična je i zasniva se na tekućinskoj terapiji, primjeni antibiotika zbog sekundarnih infekcija, promjenama u hranidbi te primjeni crijevnih adsorbensa i gelova te sistemskih protuupalnih lijekova (GRUENBERG, 2010).

Najvažnija je tekućinska terapija kojom se ispravlja dehidracija, ali i korigira acidoza. Stupanj dehidracije kod preživača određujemo prema turgoru kože i poziciji očne jabučice. Na sredini vrata načini se kožni nabor i mjeri se vrijeme potrebno za njegovo ispravljanje. Vrijeme do dvije sekunde smatra se normalnim, šest sekundi ukazuje na dehidraciju oko 8%, a duže od šest sekundi smatra se dehidracijom od 12%. Također, stupanj dehidracije može se odrediti mjerenjem udaljenosti očne jabučice od orbite. Uvučenost očne jabučice od četiri milimetra odgovara stanju od 8% dehidracije, a sedam milimetara stanju od 12%. Prisutnost i stupanj acidoze također se mogu procjenjivati, na temelju mentalnog statusa, mišićnog tonusa, sposobnosti životinje da stoji te intenzitetu refleksa sisanja. Na temelju procjene navedenih parametara odlučuje se o putu primjene elektrolitnih otopina (RADOSTITS i sur., 2007).

Kod blažeg stupnja dehidracije (do 6%) i kod životinja koje još niti ne pokazuju znakove dehidracije, ali imaju obilan proljev koriste se otopine elektrolita za peroralnu primjenu koje trebaju sadržavati natrij, kalij, glukozu, glicin ili alanin te bikarbonat, citrat ili acetat. Primjenjuju se u velikim količinama, sve dok se životinja ne rehidrira. Otopine za parenteralnu, intravensku primjenu trebale bi biti sličnog sastava, a upotrebljavaju se kod dehidracije iznad 8% i kod izraženih simptoma koji upućuju na acidozu. Također, otopina treba sadržavati i glukozu jer je telad s proljevom uglavnom u hipoglikemiji (GRUENBERG, 2010).

Ukoliko se oboljele životinje hrane mlijekom, u okviru liječenja postoji opcija da im se ono uskrati na određeno vrijeme s obzirom na to da velike količine laktoze, koja uslijed oštećenja crijevnog epitela ne može biti probavljena, nisu poželjne. S druge strane, energetske potrebe mladih životinja su velike i ne mogu biti podmirene samo peroralnim otopinama elektrolita. Prema tome, kad se i uskraćuje mlijeko, to ne smije biti duže od 24 sata (GRUENBERG, 2010).

Oštećenje crijevnog epitela koje nastaje zbog umnažanja virusa u enterocitima pogoduje sekundarnim bakterijskim infekcijama, u prvom redu kolonizaciji *E.coli*. Također, prema nekim istraživanjima, 30% teladi s teškom kliničkom slikom proljeva razvija i bakterijemiju. Prema tome, česta je primjena antimikrobnih pripravaka u liječenju rotavirusnih proljeva. Koriste se peroralni i

parenteralni pripravci, a važno je da svojim djelovanjem pokrivaju gram negativne bakterije (amoksicilin, ampicilin, ceftiofur, potencirani sulfonamidi, florkinoloni) (GRUENBERG, 2010).

2.7. Profilaksa

S obzirom na prirodu rotavirusnih infekcija, teško je postići potpunu prevenciju odnosno iskorijeniti bolest u potpunosti. Preventivne mjere ovisit će o vrsti životinja, uvjetima i načinu držanja, a naglasak se stavlja na smanjenje izloženosti uzročniku te na jačanje otpornosti tek rođenih životinja. Kada govorimo o farmским životinjama i konjima, tri su osnovna principa na kojima se bazira prevencija rotavirusnih infekcija: 1) odvajanje životinja po dobnim kategorijama i u manje skupine, izdvajanje bolesnih i održavanje higijene u staji; 2) odgovarajuća hranidba majki i novorođenih životinja, s naglaskom na uzimanje kolostruma u prvim danima; 3) cijepljenje gravidnih životinja. Primjerice, kod teladi je preporuka da u prvih 2-6 sati života dobiju kolostrum u količini jednakoj ili većoj od 5% vlastite tjelesne mase, a zatim istu količinu na svakih 12 sati, kroz prvih 48 sati života. Ukoliko telad odbija sisati, bilo da se radi o teladi držanoj s majkom ili hranjenoj ručno, primjenjuje se hranjenje sondom. Mnogi veliki uzgoji svoj teladi daju kolostrum na ovaj način, neovisno pokazuju li ili ne volju za sisanjem. Cijepljenjem gravidnih životinja postiže se veća koncentracija protutijela u kolostrumu i na taj se način mladunčad pasivnom imunizacijom štiti od pojave proljeva. Ranije su kod novorođene teladi korištena atenuirana cjepiva za oralnu primjenu, ali nisu postignuti zadovoljavajući rezultati pa se sada preporuča primjena inaktiviranih cjepiva za parenteralnu primjenu kod gravidnih životinja (RADOSTITS I SUR., 2007). U Republici Hrvatskoj u upotrebi su samo cjepiva za goveda (BoviBio ROTACOL[®], Biovita i ROTAVEC CORONA[®], Schering-Plough Animal Health), dok za druge životinjske vrste trenutno nema registriranih pripravaka. Kod pasa i mačaka, s obzirom na nisku prevalenciju i blažu kliničku sliku, ne postoji potreba za razvojem cjepiva (GREENE, 2012).

2.8. Javno zdravstvo

Rotavirusi su, kao što je i ranije navedeno, vrlo značajni crijevni patogeni kod životinja i kod ljudi. Štoviše, rotaviruse se smatra najvažnijim uzročnicima zaraznog proljeva kod djece mlađe od pet godina (TATE i sur, 2011). Procjenjuje se da godišnje oboli oko 130 milijuna djece (MARTELLA i sur., 2010), a podaci Svjetske zdravstvene organizacije pokazuju da je 2013.

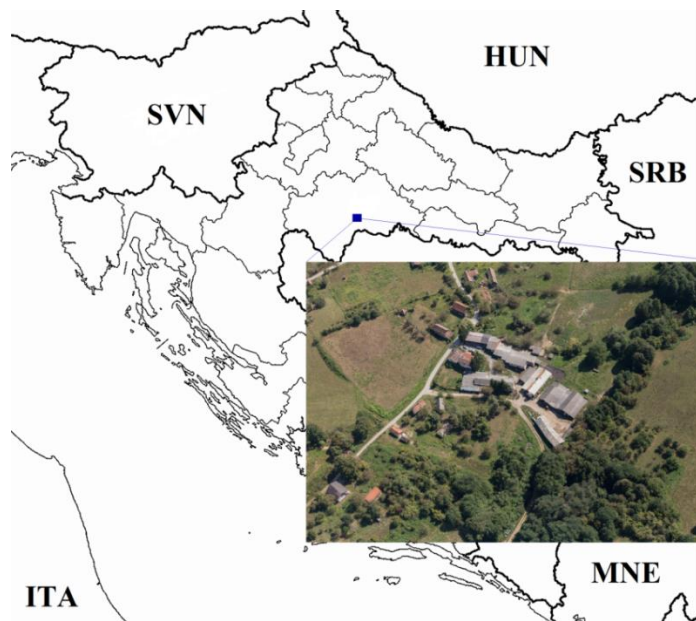
godine od rotavirusnih infekcija u svijetu umrlo njih 215 000 (TATE i sur., 2016). Smrtnost od rotavirusnih infekcija visoka je u nerazvijenim zemljama, dok je u razvijenim zemljama ona vrlo niska, zahvaljujući cijepljenju i dobroj medicinskoj skrbi. Ipak, incidencija bolesti i dalje je visoka u cijelom svijetu te rotavirusi ostaju važan javno-zdravstveni problem (SORIANO-GABARRÓ i sur., 2006).

Rotavirusne infekcije kod djece uglavnom uzrokuju humani sojevi virusa. Ranije se smatralo da su rotavirusi vrsno specifični no u kasnijim istraživanjima dokazan je prijenos rotavirusa između ljudi i životinja. Ipak, takve heterologne infekcije, primjerice infekcija ljudi sa sojem porijeklom od svinja, nisu uvijek u potpunosti uspješne i ne dovode do širenja virusa. Samo neki od sojeva RVA koje primarno nalazimo kod životinja imaju sposobnost širenja u ljudskoj populaciji (MATTHIJNSSENS i sur., 2012). Veći problem predstavlja preslagivanje genetskog materijala prilikom koinfekcije i kombiniranje RNA segmenata dvaju ili više sojeva virusa čime se novi geni unose u genetsku osnovu humanih sojeva rotavirusa. Tako nastali virusi puno su uspješniji u inficiranju domaćina i širenju u populaciji (MARTELLA i sur., 2010).

3.MATERIJAL I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorci korišteni u ovom radu prikupljeni su u prosincu 2018. i siječnju 2019. godine na Obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu (OPG) Džakula. OPG Džakula nalazi se u selu Sjeverovac u općini Sunja, Sisačko-moslavačka županija i zauzima otprilike 200 ha pašnjačkih i obradivih površina na području Sjeverovca, ali i okolnih sela Velika i Mala Gradusa, Kladari i Staro Selo (Slika 3.). Primarne djelatnosti na OPG-u su govedarstvo, ovčarstvo i svinjogojstvo, a uzgajaju se i konji i magarci. Životinje su tijekom cijele godine, s izuzetkom ovaca i svinja u zimskom periodu, na pašnjacima gdje se hrane pašom, odnosno sijenom i sjenažom. Također, na gospodarstvu se odvojeno drži i telad u predtovu koja se nabavlja s okolnih farmi mliječnih goveda u dobi od 14 dana te othranjuje mliječnom zamjenom i kasnije gotovom krmnom smjesom i sijenom do šest mjeseci starosti. Na početku prikupljanja uzoraka na gospodarstvu je bilo 135 goveda svih dobnih kategorija, 135 ovaca, 120 svinja, 16 magaraca i osam konja te osam pasa i sedam mačaka. O životinjama je skrbrilo devet osoba iz obitelji vlasnika ili djelatnika OPG-a. Životinje, kao niti ljudi, nisu ranije cijepljeni protiv rotavirusa.



Slika 3. Položaj OPG-a Džakula u Sisačko-moslavačkoj županiji. Karta je dostupna na poveznici: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Croatia_location_map.svg (NordNordWest; CC BY-SA 3.0; <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>).

3.1.1. Uzorci fecesa

Za ovaj rad prikupljeno je ukupno 117 uzoraka koji uključuju goveđi, ovčji, svinjski, magareći, konjski, pseći i mačji feces (Tablica 1.). Broj uzoraka po pojedinoj vrsti životinja određen je statistički, kako bi se dokazala prevalencija od 10% s 95% točnosti. U kategoriji teladi u predtovu uzorkovane su najmlađe životinje, starosti do tri mjeseca, iako su u uzgoju bile prisutne životinje do sedam mjeseci starosti. Također su prikupljeni uzorci fecesa svih ljudi (N= 9) koji žive ili rade na gospodarstvu (Tablica 2.).

Tablica 1. Prikupljeni uzorci fecesa životinja.

Tablica prikazuje oznake uzoraka, datum uzorkovanja te osnovne podatke o životinjama.

Redni broj	Datum uzorkovanja	Vrsta	Pasmina	Dob	Spol	Proljevanje (Da/Ne)
1	28.12.2018.	Govedo	simentalska	15d	M	Ne
2	28.12.2018.	Govedo	simentalska	2mj	Ž	Ne
3	28.12.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Ne
4	28.12.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Ne
5	28.12.2018.	Govedo	križanac s mesnom	2mj	Ž	Ne
6	28.12.2018.	Govedo	simentalska	1,5mj	M	Ne
7	28.12.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Ne
8	28.12.2018.	Govedo	križanac s mesnom	2mj	M	Da
9	28.12.2018.	Govedo	simentalska	3mj	Ž	Ne
10	28.12.2018.	Govedo	simentalska	2mj	Ž	Ne
11	28.12.2018.	Govedo	simentalska	2,5mj	M	Ne
12	28.12.2018.	Govedo	križanac s mesnom	3mj	M	Ne
13	19.1.2018.	Govedo	simentalska	1,5mj	Ž	Ne

14	19.1.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Da
15	19.1.2018.	Govedo	križanac sa simentalskom	1mj	M	Ne
16	19.1.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Ne
17	19.1.2018.	Govedo	križanac s mesnom	1mj	M	Ne
18	19.1.2018.	Govedo	simentalska	1mj	M	Ne
19	19.1.2018.	Govedo	križanac s mesnom	27d	M	Ne
20	31.1.2018.	Govedo	simentalska	10g	Ž	Ne
21	31.1.2018.	Govedo	simentalska	3g	Ž	Ne
22	31.1.2018.	Govedo	simentalska	3,5mj	Ž	Ne
23	31.1.2018.	Govedo	simentalska	2g	Ž	Ne
24	31.1.2018.	Govedo	simentalska	2mj	M	Ne
25	31.1.2018.	Govedo	simentalska	13g	Ž	Ne
26	31.1.2018.	Govedo	simentalska	5,5g	Ž	Ne
27	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	Ž	Ne
28	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
29	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
30	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	Ž	Ne
31	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
32	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
33	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	Ž	Ne
34	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
35	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
36	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	3mj	M	Ne
37	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	4mj	Ž	Ne

38	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	4mj	M	Ne
39	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	4mj	M	Ne
40	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	6mj	M	Ne
41	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	6mj	Ž	Ne
42	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	6mj	M	Ne
43	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	6mj	M	Ne
44	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	M	Ne
45	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	M	Ne
46	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	M	Ne
47	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	Ž	Ne
48	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	M	Ne
49	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	7mj	Ž	Ne
50	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	14d	M	Ne
51	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	14d	Ž	Ne
52	6.1.2019.	Svinja	c.slavonska x durok	14d	Ž	Ne
53	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	21d	M	Ne
54	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	21d	M	Ne
55	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	12d	Ž	Ne
56	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	12d	M	Ne
57	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	20d	Ž	Ne
58	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	7d	Ž	Ne
59	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	7d	M	Ne
60	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	23d	M	Ne
61	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	23d	M	Ne

62	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	17d	Ž	Ne
63	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	19d	M	Ne
64	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	19d	Ž	Ne
65	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	14d	Ž	Ne
66	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	12d	M	Ne
67	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	16d	M	Ne
68	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	17d	Ž	Ne
69	16.12.2018.	Ovca	njemački merino	16d	Ž	Ne
70	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	16d	Ž	Ne
71	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	12d	Ž	Ne
72	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	18d	M	Ne
73	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	16d	M	Ne
74	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	13d	Ž	Da
75	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	15d	Ž	Da
76	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	18d	M	Da
77	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	19d	Ž	Da
78	19.1.2019.	Ovca	njemački merino	19d	M	Ne
79	19.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	8g	Ž	Ne
80	19.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	2g	Ž	Ne
81	19.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	5g	Ž	Ne
82	19.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	2,5g	Ž	Ne
83	19.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	10g	Ž	Ne
84	31.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	13g	Ž	Ne
85	31.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	4g	M	Ne

86	31.1.2019.	Konj	hrvatski posavac	12g	M	Ne
87	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	2g	Ž	Ne
88	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	2,5g	Ž	Ne
89	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	11g	Ž	Ne
90	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	2g	Ž	Ne
91	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	7g	Ž	Ne
92	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	1mj	Ž	Ne
93	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	2g	Ž	Ne
94	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	1,5g	Ž	Ne
95	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	8g	Ž	Ne
96	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	12,5gj	Ž	Ne
97	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	7mj	M	Ne
98	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	7mj	M	Ne
99	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	7mj	Ž	Ne
100	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	4,5g	M	Ne
101	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	2g 7mj	M	Ne
102	19.1.2019.	Magarac	primorsko-dinarski	1,5g	M	Ne
103	31.1.2019.	Pas	mješanac	4,5g	Ž	Ne
104	31.1.2019.	Pas	mješanac	1g	Ž	Ne
105	31.1.2019.	Pas	njem. lovni terijer	2g	M	Ne
106	31.1.2019.	Pas	border collie	3,5g	M	Ne
107	31.1.2019.	Pas	kangal	4mj	M	Ne
108	31.1.2019.	Pas	kangal	3,5mj	Ž	Ne
109	31.1.2019.	Pas	kangal	3g	Ž	Ne

110	31.1.2019.	Pas	border collie	6g	M	Ne
111	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	2g	M	Ne
112	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	5g	Ž	Ne
113	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	3,5g	M	Ne
114	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	4g	Ž	Ne
115	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	5g	M	Ne
116	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	4,5	Ž	Ne
117	10.2.2019.	Mačka	domaća križana	5g	Ž	Ne

Tablica 2. Uzorci prikupljeni od ljudi.

Tablica prikazuje oznake uzoraka ljudskog fecesa, datum uzorkovanja i osnovne podatke o ljudima.

Oznaka uzorka	Prebivalište	Datum uzorkovanja	Dob	Spol	Proljev (Da/Ne)
1.	Sjeverovac	29.1.2019.	71g	M	Ne
2.	Sjeverovac	30.1.2019.	70g	Ž	Ne
3.	Sjeverovac	27.1.2019.	15g	M	Ne
4.	Sjeverovac	30.1.2019.	23g	Ž	Ne
5.	Sjeverovac	29.1.2019.	50g	M	Ne
6.	Sjeverovac	28.1.2019.	52g	Ž	Ne
7.	Sjeverovac	27.1.2019.	56g	Ž	Ne
8.	Sunja	31.1.2019.	31g	M	Ne
9.	Sjeverovac	31.1.2019.	27g	M	Ne

Uzorci fecesa životinja uzeti su pomoću sterilnih pamučnih briseva (Deltalab, Španjolska) izravno iz rektuma svake pojedine životinje (Slika 4.). Uzorci fecesa ljudi uzeti su također sterilnim pamučnim brisevima, ali s površine fecesa. Nakon uzorkovanja, brisevi su zamrznuti te u stiropornoj kutiji s ledenim uloškom transportirani u Laboratorij za serološku dijagnostiku virusnih bolesti Odjela za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, gdje su pohranjeni na -20°C do daljnje obrade.



Slika 4. Postupak uzorkovanja fecesa i vode (Autor: Sofija Džakula)

3.1.2. Uzorci vode

Voda je uzorkovana na tri lokacije, odnosno na različitim tipovima pojilišta i kod različitim vrsta životinja. Uzorak vode iz pašnjaka na kojem borave goveda uzet je iz potoka Gradusa (Slika 4.) koji izvire u mjestu Velika Gradusa, a ulijeva se u rijeku Savu u Gradusi Posavskoj. Drugi uzorak uzet je na pojilu za ovce. Radi se o vodovodnoj vodi koja je životinjama ponuđena u otvorenoj metalnoj posudi tijekom cijelog dana. Treći uzorak uzet je s lokalnog izvora na pašnjaku

za svinje. Za uzorkovanje su korištene sterilne plastične boce zapremine dvije litre (Deltalab, Španjolska). Uzorci su pohranjeni na +4°C te sljedeći dan dostavljeni u laboratorij gdje su odmah i obrađeni.

3.2. Priprema uzoraka

3.2.1. Priprema uzoraka fecesa

Uzorci fecesa pripremljeni su na način da je svaki bris odlomljen u prethodno označenu epruvetu (Deltalab, Španjolska) od 2 mL te mu je dodano 900 µL medija MEM 199 (Sigma Aldrich, SAD). Homogenizacija je provedena korištenjem tresilice CORNING LSE™ Vortex Mixer (Corning, SAD) tijekom 15-30 s, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje tijekom 3 min pri 18.000 x g na uređaju MIKRO 200 (Hettich, Njemačka) sa svrhom dobivanja supernatanta. Svaki uzorak u količini od 200 µl supernatanta stavljen je na ploču od 96 jažica MagMAX™ Express-96 Deep Well Plates (Applied Biosystems, SAD). Označena ploča s uzorcima zamrznuta je na -80°C do provedbe postupka izdvajanja nukleinskih kiselina.

3.2.2. Priprema uzoraka vode

Kako bi se dokazala prisutnost virusa u vodi, uzorci su podvrgnuti membranskoj filtraciji prema modificiranom protokolu norme HRN EN ISO 15216-1 Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje virusa hepatitisa A i norovirusa upotrebom RT-PCR u stvarnom vremenu – 1.dio: Metoda za kvantitativno određivanje.

Uzorcima je prvo određena pH vrijednost pomoću trakica pH-Fix 2.0 – 9.0 (Machery-Nagel, Njemačka). Svi su uzorci imali lužnat pH pa im je dodana klorovodična kiselina (HCl, 1M) kako bi se postigao neutralan pH pri kojem virus ima negativan naboj i veže se na pozitivno nabijen poliamidni membranski filter promjera pora 0,45 µm (Sartorius, Njemačka). Zatim je u uzorke dodan mengovirus MC₀ (10 µL na 2 L vode) te je boca snažno protresena. Mengovirus je nepatogeni RNA virus iz porodice *Picornaviridae* koji služi kao procesna kontrola uspješnosti membranske filtracije.

Uzorci su nadalje podvrgnuti postupku prefiltracije kako bi se uklonile krupnije čestice različitog podrijetla te spriječilo kasnije blokiranje membranskog filtera na koji se trebaju vezati virusne čestice. U tu svrhu korišteni su filteri za grubu (Assistent, Njemačka) i finu filtraciju

(Machery-Nagel, Njemačka). Istovremeno je pripremljen sustav za filtraciju (Slika 5.) koji se sastoji od pumpe i staklenih boca (Sartorius, Njemačka) u koje se ulijeva pretraživani uzorak vode. Pumpa stvara vakuum unutar donje boce (Slika 5.) te time omogućuje protok vode kroz membranski filter. Po završetku filtracije vode, membranski filter je stavljen u sterilnu epruvetu od 50 mL te je dodano 5 mL pufera TGBE (Tris/Glycine/Beef Extract) koji ima lužnati pH ($9,5 \pm 0,2$) kako bi se virus oslobodio s filtera korištenjem tresilice (IKA, Njemačka) tijekom 20 min pri 160 rpm.

Membranski filter je zatim odstranjen te je u otopinu dodano 400-500 mL HCl kako bi se ponovno postigao neutralan pH. Cijeli volumen je prenesen u epruvetu s ultrafilterom od 15 mL (Amicon Ultra -4 Centrifugal Filters; Merck Millipore, Njemačka) te je uzorak centrifugiran na 3000 x g (centrifuga Hettich, Njemačka) sve dok u gornjem dijelu epruvete s ultrafilterom nije ostalo oko 500 μ L uzorka koji je pohranjen na -80°C do izdvajanja nukleinskih kiselina.



Slika 5. Sustav za filtraciju vode

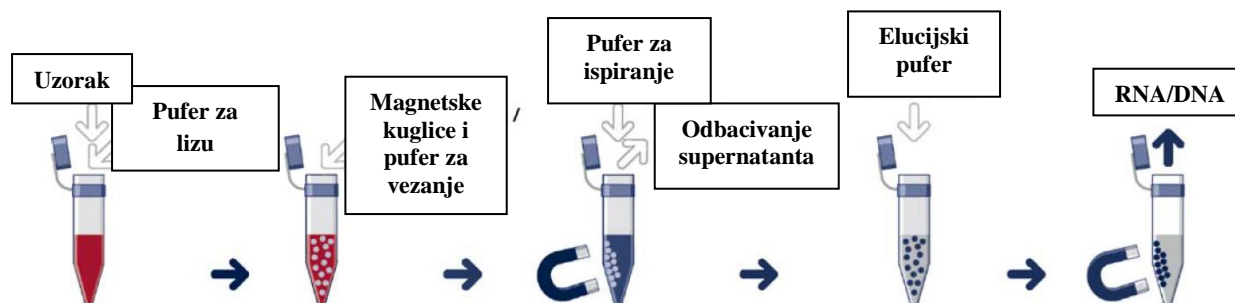
3.3. Izdvajanje nukleinskih kiselina

Izdvajanje nukleinskih kiselina iz prethodno pripremljenih suspenzija fecesa i uzoraka vode dobivenih nakon postupka membranske filtracije izvršeno je pomoću komercijalnog kompleta za izdvajanje MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems,

SAD) i uređaja KingFisher Flex (ThermoFisher Scientific, SAD) (Slika 6.), prema uputama proizvođača. Ova metoda izdvajanja temelji se na upotrebi magnetiziranih kuglica koje vežu RNA i DNA na svoju površinu (Slika 7.).



Slika 6. KingFisher Flex uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina (lijevo) i uređaj RotorGene Q za izvođenje metode RT-PCR u stvarnom vremenu. (Autor: Sofija Džakula)



Slika 7. Shematski prikaz izdvajanja RNA i DNA (preuzeto iz BERENSMEIER, 2006.)

Ukratko, u lizirani uzorak dodaju se magnetizirane kuglice. Nakon vezanja nukleinskih kiselina, kuglice se ispiru otopinom pufera te se one u zadnjem koraku odvajaju s kuglica pomoću elucijskog pufera.

3.3.1. Postupak izdvajanja nukleinskih kiselina

Prije pokretanja uređaja za izdvajanje nukleinskih kiselina KingFisher Flex pripremljene su četiri ploče, tri s reagensima i jedna s uzorcima. Komplet MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit sastoji se od sljedećih reagenasa: MagMAX™ CORE Lysis Solution, MagMAX™

CORE Binding Solution, MagMAX™ CORE Magnetic Beads, MagMAX™ CORE Proteinase K, MagMAX™ CORE Wash Solution 1, MagMAX™ CORE Wash Solution 2 i MagMAX™ CORE Elution Buffer.

Početo je važno napomenuti da je kod izračuna potrebne količine reagenasa koji se pripremaju skupno, potrebno računati s minimalno 5% više uzoraka zbog mogućih gubitaka tijekom pipetiranja.

Ploča s uzorcima pripremljena je na sljedeći način. U epruveti od 50 mL (Capp, Danska), pomiješano je po uzorku 450 µL MagMAX™ CORE Lysis Solution i 2 µL unutarnje kontrole RNA VetMAX™ Xeno™ IC RNA (Applied Biosystems, SAD). Uzorcima vode već je u postupku membranske filtracije dodan mengovirus koji se koristi kao unutarnja procesna kontrola te stoga nije uključena VetMAX™ Xeno™ IC RNA unutarnja kontrola. Zatim je 452µL ovako pripremljene otopine (ili 450 µL kod uzoraka vode) dodano u svaku jažicu ploče s dubokim jažicama (MagMAX™ Express-96 Deep Well Plates; Applied Biosystems, SAD) s prethodno dodanih 200 µL supernatanta suspenzije uzorka fecesa ili uzorka dobivenog nakon postupka membranske filtracije vode. Ploča je protresena na srednjoj brzini 5 minuta i centrifugirana na 3000 x g 5 minuta, a rezultat toga je pročišćeni lizat. U novoj pločici s dubokim jažicama (MagMAX™ Express-96 Deep Well Plates; Applied Biosystems, SAD), pomiješano je 500 µL pročišćenog lizata i 30 µL suspenzije magnetnih kuglica i proteinaze K. Ta suspenzija je prethodno pripremljena u epruveti od 5 mL (Eppendorf, Njemačka) miješanjem 20 µL MagMAX™ CORE Magnetic Beads (resuspendirano korištenjem tresilice (Capp, Danska)) i 10 µL MagMAX™ CORE Proteinase K. Ploča je potom snažno protresena te je dodano 350 µL MagMAX™ CORE Binding Solution u svaku jažicu uz miješanje pipetom.

Pored ploče s uzorcima, pripremljene su dvije dodatne ploče s dubokim jažicama (MagMAX™ Express-96 Deep Well Plates; Applied Biosystems, SAD) s reagensima za ispiranje (500 µL po jažici, MagMAX™ CORE Wash Solution 1 i MagMAX™ CORE Wash Solution 2) i jedna ploča sa standardnom dubinom jažica (MagMAX™ Express-96 Standard Plates; Applied Biosystems, SAD) s reagensom za eluciju (90 µL po jažici, MagMAX™ CORE Elution Buffer).

Ovako pripremljene pločestavljene su u KingFisher Flex uređaj (Slika 6.) zajedno sa zaštitom za magnete (MagMAX™ Express-96 Tip Comb for DW Magnets) te je uređaj pokrenut odabirom odgovarajućeg programa za predmetni komplet za izdvajanje nukleinskih kiselina.

Dobiveni izolati RNA/DNA pohranjeni su na -80°C do provedbe postupka dokazivanja rotavirusa A metodom RT-PCR u stvarnom vremenu.

3.4. Dokazivanje rotavirusa A metodom RT-PCR u stvarnom vremenu

Metoda RT-PCR u stvarnom vremenu provedena je korištenjem komercijalnog kompleta VetMAX™-Plus One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, SAD) i uređaja Rotor-Gene Q (Qiagen, Njemačka) (Slika 6.). Prvi korak u provedbi metode je denaturacija dvostruke rotavirusne RNA. Smjesa za denaturaciju (Tablica 3.) sastoji se od vode bez RNaza/DNaza i početnica (Tablica 4.). Početnice i proba specifični za dokazivanje VP2 genomskog segmenta vrste rotavirus A kod sisavaca, preuzeti su iz rada slovenskih znanstvenika (GUTIÉRREZ-AGUIRRE i sur., 2008). Sinteza početnica provedena je u tvrtki Macrogen (Južna Koreja), a proba (Applied Biosystems, SAD) je sintetizirana od strane ThermoFisher Scientific (SAD). Početnice su označene s oznakama Vp2-F1 do Vp2-F5 i Vp2-R1 do Vp-2-R2, a proba s oznakom Vp2-P.

Tablica 3. Smjesa za denaturaciju rotavirusne RNA

Naziv (koncentracija)	Volumen po jednom uzorku
Voda bez RNaza/DNaza*	2,1 µL
Početnice (10 µM)	0,9 µL
Ukupno	3 µL

*kod analize uzoraka vode volumen vode u smjesi za denaturaciju bez RNaza/DNaza uvećan je za 0,6 µL (ukupno 2,7 µL) zbog izostavljanja mješavine početnica i probe za umnožavanje VetMAX™ Xeno™ IC RNA

Tablica 4. Početnice i proba korišteni u denaturacijskoj i reakcijskoj smjesi za dokazivanje rotavirusa metodom RT-PCR u stvarnom vremenu

Oznaka početnica/probe	Nukleotidni slijed 5'→3'
Vp2-F1	TCT GCA GAC AGT TGA ACC TAT TAA
Vp2-F2	CAG ACA CGG TTG AAC CCA TTA A
Vp2-F3	TCG GCT GAT ACA GTA GAA CCT ATA AAT G
Vp2-F4	TGT CAG CTG ATA CAG TAG AAC CTA TAA ATG
Vp2-F5	TCA GCT GAC ACA GTA GAA CCTATA AAT G
Vp2-R1	GTT GGC GTT TAC AGT TCG TTC AT
Vp2-R2	GTT GGC GTC TAC AAT TCG TTC AT
Vp2-P	ATGCGCATRTRTCAAHCCAA (5'FAM, 3'MGBNFQ)*

*FAM (6-carboxyfluorescein), MGBNFQ (Minor Groove Binder Non-Fluorescent Quencher)

Ovako pripremljena smjesa (3 µL) stavljena je u svaku jažicu PCR ploče (Capp, Danska) te je dodano 3 µL izolata nukleinskih kiselina. Ploča je prekrivena folijom i inkubirana na 95°C tijekom 5 min u uređaju Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD) kako bi došlo do denaturacije dvostruke rotavirusne RNA. U međuvremenu je pripremljena reakcijska smjesa za sljedeći korak (Tablica 5). Reagensi za ovu reakcijsku smjesu dio su kompleta VetMAX™-Plus One-Step RT-PCR Kit izuzev Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay (Applied Biosystems, SAD) koji sadrži mješavinu početnica i probe potrebnih za umnožavanje VetMAX™ Xeno™ IC RNA. Ta mješavina nije dodana kod analize uzoraka vode. Navedene količine odnose se na pripremu jednog uzorka (potrebno je računati minimalno 5% više uzoraka zbog mogućih gubitaka tijekom pipetiranja). Proba korištena u ovoj reakciji opisana je u Tablici 4.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za RT-PCR u stvarnom vremenu za dokazivanje rotavirusa A

Naziv (koncentracija)	Volumen
2X RT-PCR Buffer	7,5 µL
25X RT-PCR Enzyme Mix	0,6 µL
25X Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay	0,6 µL
Proba (10µM)	0,3 µL
Ukupno	9 µL

Ovako pripremljena reakcijska smjesa stavljena je u epruvete volumena 0,1 mL (Strip Tubes and Caps; Qiagen, Njemačka) u ukupnom volumenu od 9 µL te joj je dodano 6 µL smjese denaturiranog uzorka iz prethodnog koraka. Kao pozitivna kontrola korištena je RNA humanog RVA (3 µL), dok je negativna kontrola sadržavala samo reagense (engl. No Template Control). Epruvete su zatim postavljene u kružni nosač uređaja Rotor-Gene Q te je odabran odgovarajući temperaturni protokol: 10 minuta na 45°C (reverzna transkripcija), 15 min na 95°C (početna denaturacija i aktivacija DNA polimeraze) te zatim 45 ciklusa u kojima se izmjenjuje 15 s na 95°C (denaturacija DNA) i 60 s na 60°C (vezanje početnica i probe i elongacija). Po završetku reakcije ručno je određen prag detekcije (engl. threshold) te su očitani rezultati i upisane Ct vrijednosti umnožavanja rotavirusa A i interne VetMAX™ Xeno™ IC RNA kontrole. Pozitivnim na RVA smatramo onaj uzorak koji je imao Ct vrijednost nižu od 38. Ukoliko je rezultat umnožavanja interne VetMAX™ Xeno™ IC RNA kontrole bio negativan (inhibicija RT-PCR reakcije), prethodno opisani postupak je ponovljen na istim uzorcima, ali ovaj puta razrijeđenim 1/10, 1/100 i 1/1000 s vodom bez RNaza/DNaza.

3.3. Dokazivanje mengovirusa metodom RT-PCR u stvarnom vremenu

S obzirom da je kao procesna kontrola kod uzoraka vode korišten mengovirus, provedeno je njegovo dokazivanje metodom RT-PCR u stvarnom vremenu korištenjem početnica i probe navedenih u tablici 6.

Za dokazivanje mengovirusa korištene su dvije početnice (110 F i 209R) i jedna proba (147P) (PINTÓ R.M.i sur., 2009). Sinteza početnica provedena je u tvrtki Macrogen (Južna Koreja), a proba (Applied Biosystems, SAD) je sintetizirana od strane ThermoFisher Scientific (SAD). Korišteni reagensi za RT-PCR u stvarnom vremenu su isti kao i kod dokazivanja RVA (VetMAX™-Plus One-Step RT-PCR Kit). Sastav reakcijske smjese naveden je u tablici 7. Reagensi su dio kompleta VetMAX™-Plus One-Step RT-PCR Kit. Navedene količine odnose se na pripremu jednog uzorka (potrebno je računati minimalno 5% više uzoraka zbog mogućih gubitaka tijekom pipetiranja).

Tablica 6. Početnice i proba za dokazivanje mengovirusa

Oznaka početnica/probe	Nukleotidni slijed 5'→3'
110F	GCGGGTCCTGCCGAAAGT
209R	GAAGTAACATATAGACAGAGGCACAC
147P	ATCACATTACTGGCCGAAGC (5'FAM, 3'MGBNFQ)

Tablica 7. Reakcijska smjesa za RT-PCR u stvarnom vremenu za dokazivanje mengovirusa

Naziv (koncentracija)	Volumen
2X RT-PCR Buffer	7,5 µL
Mješavina početnica i probe (10µM)	0,75 µL
25X RT-PCR Enzyme Mix	0,6 µL
Voda bez RNaza/DNaza	1,15 µL
Ukupno	10 µL

Ovako pripremljena reakcijska smjesa stavljena je u epruvete volumena 0,1 mL (Strip Tubes and Caps; Qiagen, Njemačka) u ukupnom volumenu od 10 µL te joj je dodano 5 µL izolata nukleinskih kiselina iz uzorka vode. Kao pozitivna kontrola korišten je RNA izolat referentnog

mengovirusa MC₀ umnoženog na staničnoj kulturi, a negativna kontrola je sadržavala samo reagent (engl. No Template Control). Epruvete su zatim postavljene u kružni nosač uređaja Rotor-Gene Q te je odabran isti temperaturni protokol kao kod dokazivanja rotavirusa A (3.4). Po završetku reakcije ručno je određen prag detekcije (engl. threshold) te su očitani rezultati i upisane Ct vrijednosti umnožavanja mengovirusa.

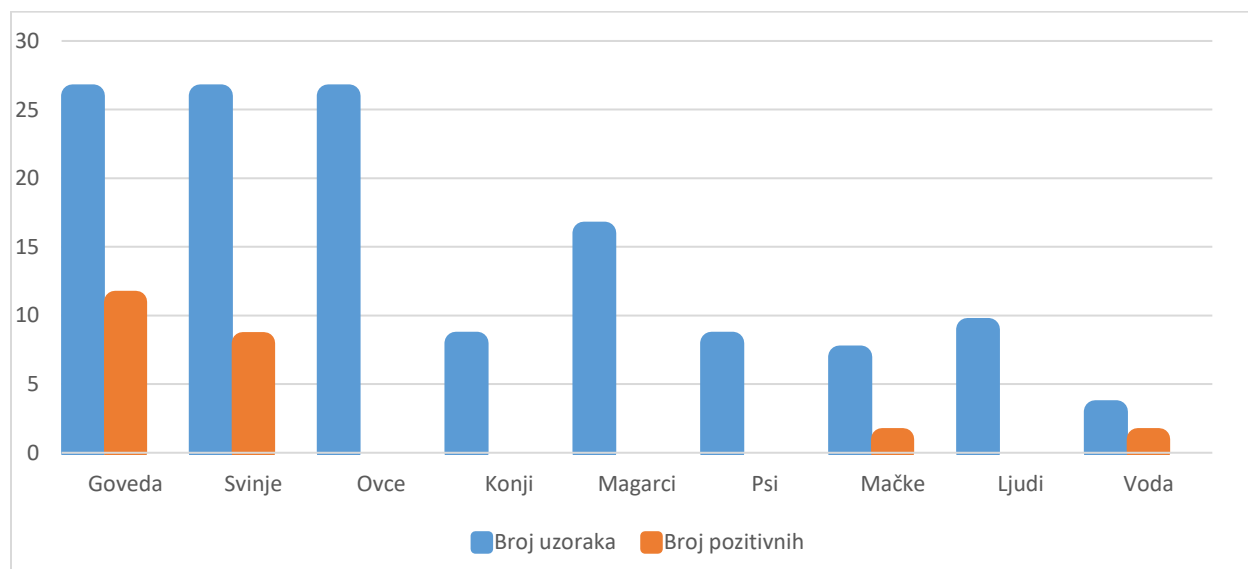
4. REZULTATI

Tijekom ovog istraživanja uzorkovano je ukupno 117 uzoraka goveđih, ovčjih, svinjskih, magarećih, konjskih, psećih i mačjih fecesa; 9 uzoraka fecesa ljudi i 3 uzorka vode. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu prisustvo RVA utvrđeno je u ukupno 21 uzorku (16,28%).

Od 117 uzoraka porijeklom od domaćih životinja pozitivno je bilo njih 20 (17,1%). Distribucija pozitivnih uzoraka po vrstama značajno se razlikovala. Tako su pozitivni uzorci utvrđeni u 42,3% (11/26) pretraženih goveda, 30,8% (8/26) svinja te 14,3% (1/7) mačaka.

U uzorcima fecesa ovaca, konja, magaraca i pasa nije dokazana prisutnost rotavirusa A, kao niti u pretraženim uzorcima fecesa ljudi koji rade na istraživanom obiteljskom gospodarstvu. U sedam uzoraka fecesa konja i magaraca došlo je do inhibicije PCR reakcije, ali je razrjeđivajem uzoraka potvrđena prisutnost VetMAX™ Xeno™ IC RNA kao unutarnje kontrole, uz negativan rezultat na prisutnost RVA.

U okviru ovog istraživanja pretražena su i tri uzorka vode s tri različita pojilišta za životinje. Uzorak vode iz potoka Gradusa, s pašnjaka na kojem borave goveda u pašnom sustavu, bio je pozitivan, dok u uzorcima vode iz pojilišta za ovce (vodovodna voda) i svinje (lokalni izvor) nije dokazana prisutnost rotavirusa A (Slika 8).



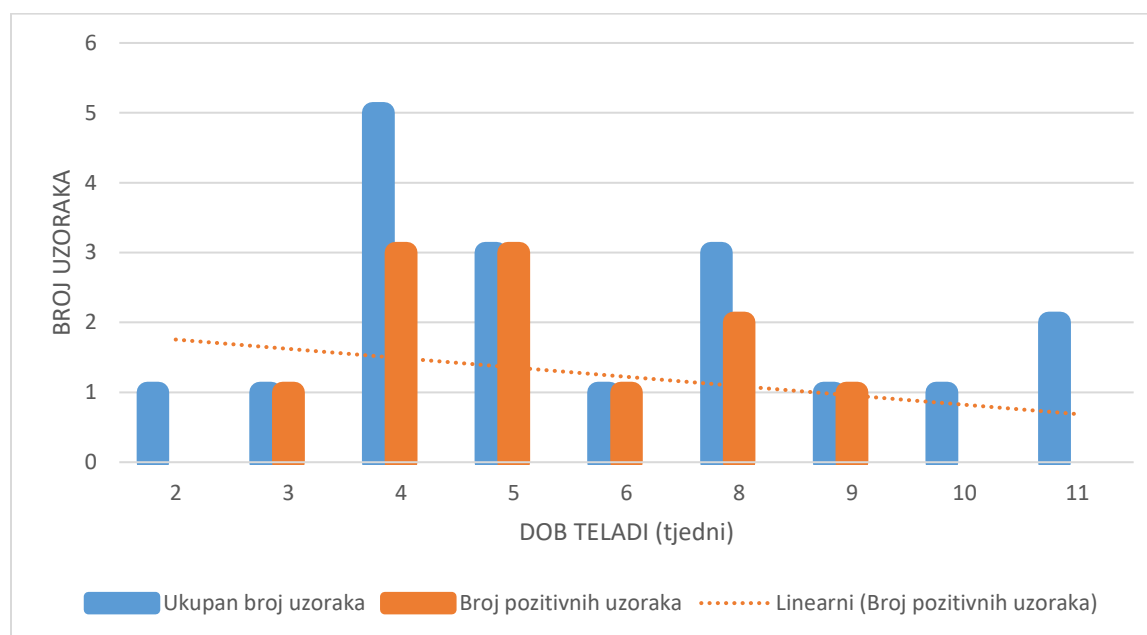
Slika 8. Prikaz ukupno uzorkovanih i pozitivnih uzoraka

Od ukupno 26 prikupljenih uzoraka fecesa goveda, 18 uzoraka bilo je porijeklom od teladi u predtovu, a osam od krava i teladi u pašnom sustavu. Prisustvo RVA dokazano je samo unutar skupine teladi u predtovu gdje je čak 61,11% (11/18) uzoraka bilo pozitivno (Tablica 8). Distribucija pozitivnih uzoraka po dobnim kategorijama teladi prikazana je na slici 9, a odnos dobi i Ct vrijednosti na slici 10. vU trenutku uzimanja uzoraka samo su dva teleta u predtovu imala proljev i oba su bila pozitivna na RVA. U uzorcima fecesa goveda koja su držana u pašnom sustavu nije bilo pozitivnih rezultata (Tablica 9.).

Tablica 8. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za telad u predtovu

Redni broj	Dob (tjedni)	Spol	Pasmina	Proljev (Da/Ne)	Rezultat/Ct vrijednost
1.	2	M	simentalska	Ne Neg	
2.	3	M	križanac s mesnom	Ne	Poz/ 16,94
3.	4	M	simentalska	Ne	Poz/37,03
4.	4	M	simentalska	Ne	Neg
5.	4	M	simentalska	Da	Poz/34,14
6.	4	M	križanac sa simentalskom	Ne	Neg
7.	4	M	simentalska	Ne	Poz/31,63
8.	5	M	simentalska	Ne	Poz/26,52
9.	5	M	križanac s mesnom	Ne	Poz/34,76
10.	5	M	simentalska	Ne	Poz/29,87
11.	6	M	simentalska	Ne	Poz/20,64
12.	8	Ž	simentalska	Ne	Neg
13.	8	Ž	križanac s mesnom	Ne	Poz/ 19,4
14.	8	M	križanac s mesnom	Da	Poz/36,06
15.	9	Ž	simentalska	Ne	Poz/33,18

16.	10	M	simentalska	Ne	Neg
17.	11	M	križanac s mesnom	Ne	Neg
18.	11	Ž	simentalska	Ne	Neg

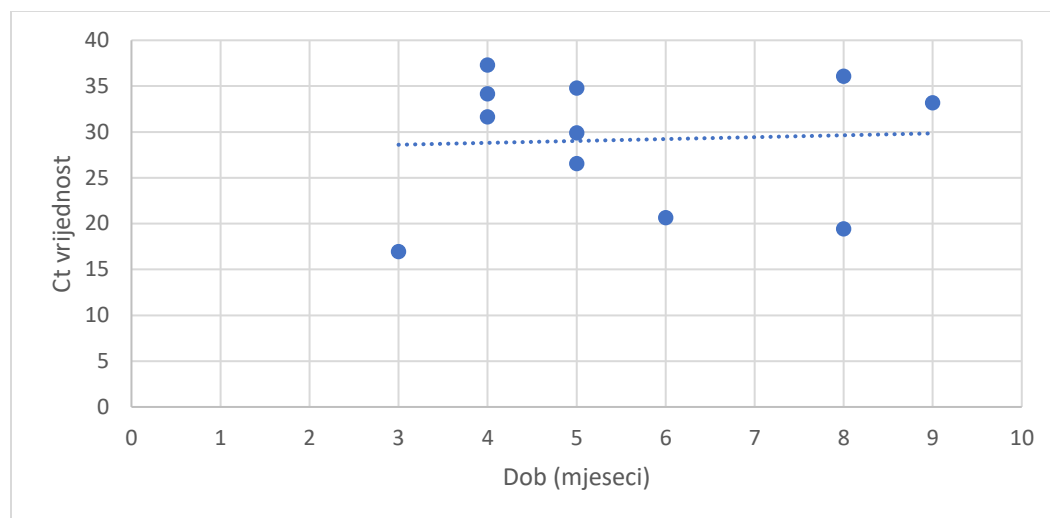


Slika 9. Broj pozitivnih uzoraka kod teladi u predtovu po dobnim kategorijama

Tablica 9. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za goveda u pašnom sustavu

Redni broj	Dob	Spol	Pasmina	Proljevi (Da/Ne)	Rezultat/Ct vrijednost
1.	1,5mj	Ž	simentalska	Ne	Neg
2.	2mj	M	simentalska	Ne	Neg
3.	3,5mj	Ž	simentalska	Ne	Neg
4.	2g	Ž	simentalska	Ne	Neg
5.	3g	Ž	simentalska	Ne	Neg
6.	5,5g	Ž	simentalska	Ne	Neg
7.	10g	Ž	simentalska	Ne	Neg

8.	13g	Ž	simentalska	Ne	Neg
----	-----	---	-------------	----	-----



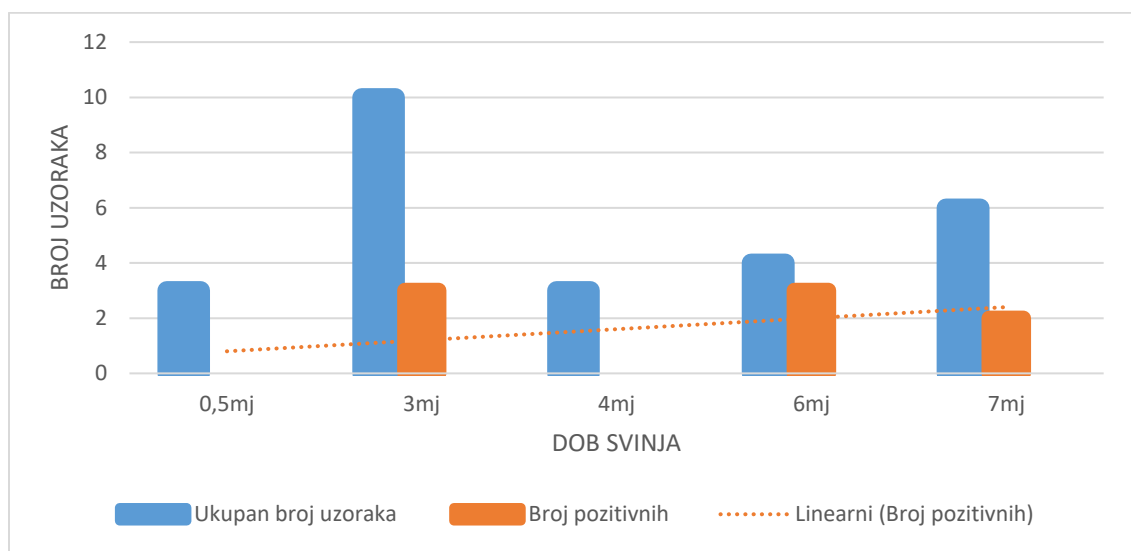
Slika 10. Odnos dobi i Ct vrijednosti kod pozitivnih uzoraka od teladi u predtovu

Od ukupno 26 uzoraka fecesa svinja, na RVA pozitivno je njih 8, dakle 30,8% (Tablica 10.). Tri uzorka od prasadi stare dva tjedna su negativna. Kod životinja starosti tri mjeseca pozitivno je 30% (3/10) uzoraka, dok kod svinja starih četiri mjeseca nema pozitivnih uzoraka. U kategoriji životinja starosti šest mjeseci pozitivno je 75% (3/4) uzoraka, a kod sedam mjeseci starih životinja 33% (2/6) (Slika 11).

Tablica 10. Rezultati RT-PCR u stvarnom vremenu za svinje

Redni broj	Dob	Spol	Pasmina	Proljev (Da/Ne)	Rezultat/Ct vrijednost
1.	14d	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
2.	14d	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg
3.	14d	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg
4.	3mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Poz/35,16
5.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
6.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
7.	3mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg

8.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
9.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Poz/ 33,68
10.	3mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Poz/ 33,68
11.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
12.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
13.	3mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
14.	4mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg
15.	4mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
16.	4mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
17.	6mj	M	c.slavonska x durok	NE	Poz/35,11
18.	6mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Poz/32,52
19.	6mj	M	c.slavonska x durok	NE	Poz/35,12
20.	6mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
21.	7mj	M	c.slavonska x durok	NE	Poz/34,13
22.	7mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
23.	7mj	M	c.slavonska x durok	NE	Neg
24.	7mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg
25.	7mj	M	c.slavonska x durok	NE	Poz/35,13
26.	7mj	Ž	c.slavonska x durok	NE	Neg



Slika 11. Broj pozitivnih uzoraka po različitim dobnim kategorijama svinja

Od sedam uzorkovanih mačaka, samo je kod jedne životinje dokazana prisutnost RVA, uz Ct vrijednost koja iznosi 35,77. Radi se o domaćem križanom mačku starom 5 godina koji u trenutku uzimanja uzorka nije imao proljev.

U jednom od tri pretraživana uzorka vode dokazana je prisutnost RVA. Uzorak je uzet iz potoka Gradusa, u pašnjaku za goveda. Ct vrijednost za rotavirus A u tom uzorku iznosi 30,86.

5. RASPRAVA

Rotavirus A smatra se jednim od glavnih uzročnika gastroenteritisa kod ljudi, svinja, preživača, konja, pasa, mačaka i peradi. Kod goveda i svinja odgovoran je za značajne ekonomske gubitke koji se ogledaju kroz povećanu smrtnost, troškove liječenja i smanjen prirast (MARTELLA i sur., 2007).

U ovom istraživanju prikazana je prisutnost i proširenost RVA u različitim vrsta životinja, ljudi i okolišu na jednom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu u Sisačko-moslavačkoj županiji. Metodom RT-PCR u stvarnom vremenu dokazana je prisutnost RVA u 20 uzoraka fecesa životinja te u jednom uzorku vode. Kako je i očekivano, distribucija pozitivnih uzoraka značajno se razlikovala s obzirom na porijeklo uzoraka.

Prevalencija infekcije rotavirusom A kod goveda u ovom istraživanju iznosi 42,3%. Prevalencija rotavirusne infekcije u teladi, utvrđena u drugim istraživanjima, kreće se između 7% (SELIM i sur., 1991) i 90% (CASTRUCCI i sur., 1988), a prosječnom vrijednošću smatra se 30-40% (DHAMA i sur., 2009) što je slično prevalenciji dobivenoj u ovom istraživanju. Ipak, treba uzeti u obzir da su u navedenim istraživanjima korištene dijagnostičke metode različite osjetljivosti te da su uzorkovane životinje različite starosti i zdravstvenog statusa.

Tako je istraživanjem koje je provedeno na području Europe, utvrđena prevalencija od 5% u Mađarskoj i Sloveniji gdje su uzorci uzimani uglavnom od zdravih životinja, kao i u ovom istraživanju (samo su dvije od 26 životinja imale proljev) (MIDGLEY i sur., 2012). U Francuskoj i Danskoj, gdje su uzorkovane životinje s proljevom, prevalencija je iznosila 15% i 46% (MIDGLEY i sur., 2012). S obzirom na to da je od 11 teladi, koja je pozitivna na rotavirus A, u ovom istraživanju samo dvoje imalo proljev, a na RVA je pozitivno čak 42,3% pretražvanih životinja, možemo govoriti o visokom stupnju subkliničke infekcije u pretraživanom uzgoju.

Teško je sa sigurnošću tvrditi zašto je u ovom istraživanju ustanovljena viša prevalencija rotavirusne infekcije kod zdravih životinja, ali jedan od razloga je zasigurno veća osjetljivost metode RT-PCR u stvarnom vremenu u odnosu na konvencionalni RT-PCR korišten u Sloveniji ili metode dokazivanja segmenat rotavirusne RNA na poliakrilamidom gelu (RNA-PAGE) korištene u Mađarskoj (MIDGLEY i sur., 2012). Također, treba uzeti u obzir i znatan nedostatak sličnih istraživanja rotavirusa kod životinja općenito, pa samim time i podataka za usporedbu. No svakako je nužno provesti dodatna istraživanja na većem uzorku životinja, uzimajući u obzir dob, način držanja životinja i faktore stresa.

Svi pozitivni rezultati bili su u skupini teladi u predtovu koja na gospodarstvo dolazi s drugih farmi, s otprilike 14 dana starosti, dok među uzorcima od goveda koja se drže u pašnom sustavu nema pozitivnih rezultata. S druge strane, uzorak vode u kojem je dokazano prisutstvo RVA potječe s pojila za pašno držana goveda, dok telad u predtovu nema pristup istom. S obzirom na to da se goveda istovremeno drže na sedam različitih, odvojenih pašnjaka i povremeno premještaju između njih, a u vrijeme uzimanja uzoraka o tome nije vođena evidencija, teško je dovoditi u vezu nalaz RVA u vodi i negativan nalaz kod pašno držanih goveda. Nadalje, u vrijeme uzimanja uzoraka kod pašno držanih životinja nije bilo telenja pa pretraživani uzorak obuhvaća svega troje teladi mlađe od tri mjeseca i pet odraslih životinja. S obzirom na tako mali broj uzoraka fecesa teladi iz pašnog sustava, nije iznenađujuće da nije dokazan niti jedan pozitivan uzorak. Također, bez genotipizacije virusa, ne može se niti dovoditi u vezu nalaz kod goveda u paši i nalaz u vodi. Kako bi se dobio bolji uvid u prisutnost i proširenost rotavirusa A kod pašno držanih goveda potrebna su daljnja istraživanja. Ipak, dokaz RVA u uzorku vode pokazuje da su pašno držane životinje izložene rotavirusima, ali zasigurno u manjoj mjeri u odnosu na telad u predtovu koja se drži u zatvorenom sustavu i na malom prostoru. Uz to, možemo reći da telad u predtovu može imati slabiju opću otpornost, s obzirom na stres zbog transporta i načina držanja.

Kod teladi u predtovu ovim je istraživanjem ustanovljen blagi trend rasta Ct vrijednosti u starijih dobnih kategorija što bi moglo upućivati na smanjenje količine uzročnika u fecesu. Ipak, taj trend treba uzeti s oprezom s obzirom na to da se radi o malom broju uzoraka (11 teladi u predtovu pozitivne na RVA) te da nije rađen kvantitativni RT-PCR i statistička analiza podataka, što je svakako nužno. U konkretnom slučaju, upravo mali broj uzoraka čini svaku statističku analizu relativno nepouzdanom.

Ovim istraživanjem ustanovljena je prisutnost RVA kod 30,8% pretraženih svinja od kojih niti jedna nije pokazivala kliničke znakove rotavirusne infekcije. Vrijednost prevalencije u ovom istraživanju najbliža je prevalenciji u radu autora PAPP i sur., 2013a koja iznosi 24%. U istraživanju provedenom na životinjama koje nisu imale proljev, u Sloveniji je, kod svinja mlađih od tri mjeseca, dokazana prevalencija 20%, a kod životinja mlađih od šest mjeseci u Španjolskoj 7% (MIDGLEY i sur., 2012); u Argentini 3,3% (PARRA i sur., 2007), u Kanadi 8,3% (MARTEL-PARADIS i sur., 2013) i u Irskoj 6,5% (COLLINS i sur., 2010), što je sve znatno niže nego što je ustanovljeno ovim istraživanjem. Treba naglasiti da su u većini ovih istraživanja korištene različite dijagnostičke metode, s različitim stupnjem osjetljivosti što onda ima utjecaj na razlike u

rezultatima. Primjerice PARRA i sur., 2007. u svojem su istraživanju koristili imunoenzimni test (ELISA) koji ima manju osjetljivost u odnosu na RT-PCR u stvarnom vremenu koji je korišten u ovom istraživanju. Također, potrebno je uzeti u obzir razlike u dokazanim prevalencijama s obzirom na dob životinja koje su uzorkovane, a koja se razlikuje od istraživanja do istraživanja.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju trend linearnog rasta broja pozitivnih uzoraka od mlađih prema starijim dobnim kategorijama svinja, iako druga istraživanja pokazuju da su rotavirusne infekcije češće upravo kod životinja do tri mjeseca starosti (STEYER i sur., 2008). Ovakav trend najvjerojatnije je posljedica malog broja uzoraka upravo od životinja starosti do tri mjeseca (samo tri uzorka).

Za pretpostaviti je da se većina dosadašnjih istraživanja temelji na uzorcima prikupljenim od svinja iz intenzivnog uzgoja, dok se ovdje radi o ekstenzivnom načinu držanja koji uključuje držanje na otvorenom, miješanje različitih dobnih kategorija životinja, kao i potencijalni kontakt s drugim domaćim i divljim životinjama što možda može imati utjecaj na proširenost infekcije rotavirusom A i međuvrni prijenos kao preduvjet za pojavu genomskog preslagivanja

Rotavirusne infekcije kod mačaka i pasa relativno su rijetke; GERMAN i sur., 2015 u svojem istraživanju na 1727 uzoraka fecesa mačaka, ustanovili su ukupnu prevalenciju od 3%. Iako je u našem istraživanju prevalencija RVA u fecesu mačaka bila značajno viša (14.3%), teško je uspoređivati ove rezultate s obzirom na relativno mali broj uzoraka prikupljen u našem istraživanju. Nadalje, u obzir treba uzeti i uvjete i način držanja mačaka. Naime, u navedenom ispitivanju sudjelovale su životinje iz nekoliko gradova u Ujedinjenom Kraljevstvu, točnije iz 25 različitih skloništa za životinje. Mačke se u skloništima drže u odvojenim odjeljcima i uz vrlo visoke biosigurnosne mjere, ali na malom prostoru i uz stalan priljev novih životinja (GERMAN i sur., 2015.) S druge strane, mačke koje su uzorkovane u ovom istraživanju žive slobodno na poljoprivrednom gospodarstvu te dolaze u kontakt s drugim vrstama životinja koje na njemu borave, u prvom redu s teladi u predtovu. Prema tome, može se pretpostaviti da su ovdje mačke u puno većoj mjeri izložene heterolognim sojevima RVA koji su podrijetlom od drugih vrsta životinja, dok su mačke u skloništima izložene homolognim sojevima. Da bi se ustanovila poveznica između dobivenih rezultata potrebno je provesti daljnja istraživanja i genotipizaciju virusa.

Kod uzoraka porijeklom od ovaca, konja, magaraca i pasa u ovom istraživanju nije dokazan RVA. Za rotavirusne infekcije kod ovaca može se reći da je epizootiologija još uvijek vrlo slabo

istražena. Nadalje, prema podacima dosadašnjih istraživanja kod ovaca su češće infekcije rotavirusom B, ali ustanovljeni su i brojni slučajevi infekcije rotavirusom A. RVA je kod ovaca dokazan uglavnom u slučajevima masovnog izbijanja proljeva kod janjadi (PAPP i sur., 2014), rijetko kod asimptomatskih životinja kao ovdje. Prema tome, može se reći da rezultati ovog istraživanja nisu neočekivani.

Rotavirusi su kod konja opisani kao najčešći uzrok proljeva u ždrebadi mlađe od dva mjeseca (PAPP i sur., 2013^b), a u vrijeme provođenja uzorkovanja za ovo istraživanje na gospodarstvu nije bilo ždrebadi, već su uzorkovani konji stariji od dvije godine.

Kod ljudi su rotavirusi značajni kao uzročnici gastroenteritisa kod djece mlađe od pet godina (TATE i sur, 2011). Ovim istraživanjem obuhvaćene su samo odrasle osobe kod kojih nije dokazana prisutnost RVA. Ipak, zbog utvrđenih pozitivnih rezultata kod životinja, s kojima su ljudi u svakodnevnom kontaktu, i zoonotskog potencijala RVA, možemo reći da postoje preduvjeti za prijenos uzročnika između vrsta te za preslagivanje genetskog materijala između različitih sojeva rotavirusa u slučaju koinfekcije.

Jedan od tri uzorka vode pretraženih u ovom istraživanju pozitivan je na RVA, kako je već ranije spomenuto. Nalaz RVA u vodi nije rijetkost; ranija istraživanja pokazuju učestalost od 35,1% (71/202) (CASTELLS i sur., 2015) i 25% (38/152) (STEYER i sur., 2011). U ovom istraživanju radi se o uzorku vode iz potoka Gradusa na kojem vodu piju goveda. Potok je sam po sebi izložen različitim potencijalnim izvorima kontaminacije kao što su domaće i divlje životinje odnosno njihov izmet, površinske i otpadne vode. Ovaj pozitivan nalaz značajan je jer predstavlja okolišnu kontaminaciju, a time i rizik za životinje, a potencijalno i za ljude. U tom kontekstu bilo bi zanimljivo pretražiti veći broj uzoraka vode na širem području kao i provesti genotipizaciju pronađenih virusa što bi u kombinaciji s istim podacima za životinje i ljude temeljilo molekularnu epidemiološko-epizootiološku analizu u skladu s načelom „Jedno zdravlje“ (engl. *One Health*). Upravo takve analize, koje se provode istovremeno u određenom ekosustavu, predstavljaju preduvjet za procjenu zoonotskog potencijala sojeva RVA i to posebno ako im je osnova određivanje molekularnih značajki svih segmenata cijelog genoma različitih sojeva RVA.

6. ZAKLJUČCI

1. Rotavirus A prisutan je na istraživanom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu s ukupnom prevalencijom od 16,28%. Prisutnost rotavirusa dokazana je kod goveda, svinja i mačaka te u jednom uzorku vode.
2. Distribucija RVA razlikuje se po vrstama životinja; pozitivni uzorci utvrđeni su u 42,3% (11/26) pretraženih goveda, 30,8% (8/26) svinja te 14,3% (1/7) mačaka.
3. Kod teladi u predtovu prevalencija RVA izrazito je visoka i iznosi čak 61,11% (11/18).
4. U pretraživanom uzgoju ustanovljen je visok stupanj subkliničke infekcije, prevalencija infekcije RVA kod životinja bez proljeva iznosi 37,5% kod goveda i 30,8% kod svinja.
5. Relativno visoku prevalenciju rotavirusne infekcije u mačaka (14,3%) utvrđenu ovim istraživanjem treba uzeti s rezervom zbog malog uzorka, no dobiveni rezultati mogli bi se objasniti povećanom izloženošću.
6. Razlike u rezultatima ovog i ranijih sličnih istraživanja djelomično su posljedica i korištenja različitih dijagnostičkih metoda, različite dobi, načina držanja i zdravstvenog statusa životinja.
7. Nalaz RVA u vodi predstavlja okolišnu kontaminaciju, a time moguće i rizik za infekciju životinja, a potencijalno ljudi.
8. Potrebna su daljnja opsežnija istraživanja u skladu s načelom „Jedno zdravlje“, koja bi obuhvatila veći broj uzoraka sa šireg područja te uključila genotipizaciju i analizu molekularnih značajki cijelog genoma dokazanih sojeva RVA što predstavlja preduvjet za procjenu zoonotskog potencijala RVA u ekosustavu određene regije ili države.

7.LITERATURA

1. ANONYMOUS (2019a): ICTV. Rotavirus Taxonomy. Dostupno na <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; pristupljeno 10. rujna 2019.
2. ANONYMOUS (2019b): RCWG. List of accepted genotypes by Rotavirus Classification Working Group. Dostupno na <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>; pristupljeno 15. ožujka 2019.
3. ANONYMOUS (2019c): EuroRotaNet. Rotavirus detection and typing methods. UK: EuroRotaNet; 2009. <https://www.eurorotanet.com/project-information/documents-and-methods/>pristupljeno 10. rujna 2019.
4. BÁNYAI, K., G. KEMENESI, I. BUDINSKI, F.FÖLDES, B. ZANA, S. MARTON, M. OLDAL, K. KURUCZ, F. JAKAB (2017): Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19–26.
5. BERENSMEIER, S. (2006): Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 495–504.
6. BLACKHALL, J., A.FUENTES, G. MAGNUSSON (1996): Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology* 225(1), 181-190.
7. BUSI, C., V. MARTELLA, A. PAPETTI, C. SABELLI, D. LELLI, G. LORIS ALBORALI, L. GIBELLI, D. GELMETTI, A. LAVAZZA, P. CORDIOLI, M.B. BONIOTTI (2017): Group A Rotavirus Associated with Encephalitis in Red Fox. *Emerg. Infect. Dis.* 23 (9), 1535-1538.
8. CASTRUCCI, G., F. FRIGERI, M. FERRARI, V. CILLI, G.L. GUALANDI, V. ALDROVANDI (1988): Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. *Comp. Immunol. and Microb.* 11, 71–84.

9. COLLINS, P. J., V., MARTELLA, R.D. SLEATOR, S. FANNING, S., H., O'SHEA (2010.): Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol*, 155(8), 1247-59.
10. CRAWFORD, S. E., S. RAMANI, J.E. TATE, U.D. PARASHAR, L. SVENSSON, M. HAGBOM, M. FRANCO, H. GREENBERG, M. O'RYAN, M., G. KANG, U. DESSELBERGER, M.K. ESTES (2017): Rotavirus infection HHS Public Access. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3(1)
11. CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Školska knjiga, Zagreb, 141-144.
12. DHAMA, K., R.S. CHAUHAN, M. MAHENDRAN, S.V.S. MALIK (2009): Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33(1), 1–23.
13. GERMAN, A. C., M. ITURRIZA-GÓMARA, W. DOVE, M. SANDRASEGARAM, T. NAKAGOMI, O. NAKAGOMI, N. CUNLIFFE, A.D. RADFORD, K.L. MORGAN (2015): Molecular epidemiology of rotavirus in cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 53(2), 455–464.
14. GÓMEZ-RIAL, J., S. SÁNCHEZ BATÁN, I. RIVERO-CALLE, J. PARDO-SECO, J. MARTINÓN-MARTÍNEZ, A. SALAS, F. MARTINÓN-TORRES (2018): Rotavirus infection beyond the gut. *Infect. Drug. Resist.* 12, 55-64.
15. GREENE, C. E. (2012): *Infectious Disease of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Luis, str. 79 i str. 91.
16. GRUENBERG, W. (2010): Diarrhea in neonatal calves. U: *The Merck Veterinary Manual*. (Kahn, C. M., ur.), Merck & Co, str. 252-257.
17. GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I., A. STEYER, J. BOBEN, K. GRUDEN, M. POLJŠAK-PRIJATELJ, M. RAVNIKAR (2008): Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes

- with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 46(8), 2547–2554.
18. KIULIA, N.M., N. HOFSTRA, L.C. VERMEULEN, M.A. OBARA, G. MEDEMA, J.B. ROSE (2015): Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. *Pathogens* 4, 229-255.
 19. MARTEL-PARADIS, O., M.A. LAURIN, V. MARTELLA, J.S. SOHAL, Y. L'HOMME (2013): Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 162(1), 94-102.
 20. MARTELLA, V., K. BÁNYAI, J. MATTHIJNSSENS, C. BUONAVOGLIA, M. CIARLET (2010): Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.*, 140(3–4), 246–255.
 21. MARTELLA, V., K. BÁNYAI, E. LORUSSO, A.L. BELLACICCO, N. DECARO, M. CAMERO, G. BOZZO, P. MOSCHIDOU, S. ARISTA, G. PEZZOTTI, A. LAVAZZA, C. BUONAVOGLIA, C. (2007): Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet. Microbiol.* 123(1-3), 26-33.
 22. MATTHIJNSSENS, J., M. CIARLET, M. RAHMAN, H. ATTOUI, M.K. ESTES, J.R. GENTSCH, M. ITURRIZA-GÓMARA, C. KIRKWOOD, P.P.C. MERTENS, O. NAKAGOMI, J.T. PATTON, M. FRANCO, L.J. SAIF, N. SANTOS, A. STEYER, K. TANIGUCHI (2008): Recommendations for the classification of group A rotavirus. *Arch. Virol.* 153(8), 1621–1629.
 23. MATTHIJNSSENS, J., V. MARTELLA, M. VAN RANST (2010): Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virol.* 5(4), 385–390.
 24. MATTHIJNSSENS, J., M. VAN RANST (2012): Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2(4), 426–433.

25. MCDONALD, S. M., M.I. NELSON, P.E. TURNER, J.T. PATTON (2016): Reassortment in segmented RNA viruses: Mechanisms and outcomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(7), 448–460.
26. MIDGLEY, S. E., K. BÁNYAI, J. BUESA, N. HALAIHEL, C.K. HJULSAGER, F. JAKAB, J. KAPLON, L.E. LARSEN, M. MONINI, M. POLJŠAK-PRIJATELJ, P. POTHIER, F.M. RUGGERI, A. STEYER, M. KOOPMANS, B. BÖTTIGER (2012): Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156(3–4), 238–245.
27. PAPP, H., B. LÁSZLÓ, F. JAKAB, B. GANESH, S. DE GRAZIA, J. MATTHIJNSSENS, M. CIARLET, V. MARTELLA, K. BÁNYAI (2013^a): Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190-199
28. PAPP H., J. MATTHIJNSSENS, V. MARTELLAC, M. CIARLET, K. BÁNYAI (2013^b): Global distribution of group A rotavirus strains in horses: A systematic review. *Vaccine* 31, 5627–5633.
29. PAPP, H., Y.S. MALIK, S.L. FARKAS, F. JAKAB, V. MARTELLA, K. BÁNYAI (2014): Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *Virus Dis.* 25(2), 215–222.
30. PARRA, G.I., G. VIDALES, J.A. GOMEZ, F.M. FERNANDEZ, V. PARREÑO, K. BOK (2007): Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet. Microbiol.* 126(1-3): p. 243-50.
31. PINTÓ R.M., M.I. COSTAFREDA, A. BOSCH (2009): Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(23), 7350-7355.
32. RADOSTITS, O. M., C.C. GAY, W.H. HINCHCLIFF, P.D. CONSTABLE (2007): A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats., Saunders Elsevier,

Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St.Louis, Sydney, Toronto, 1286-1296.

33. SELIM, S.A., K.M. AZIZ, A.J. SARKER, H. RAHMAN (1991): Rotavirus infection in calves in Bangladesh. *Vet. Res. Commun.* 15, 327–333
34. SORIANO-GABARRÓ, M., J. MRUKOWICZ, T. VESIKARI, T. VERSTRAETEN (2006): Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Ped. Infect. Dis. J.* 25(1), 7–11.
35. STEYER, A., M. POLJŠAK-PRIJATELJ, D. BARLIČ-MAGANJA, J. MARIN (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen.Virol.* 89(7), 1690–1698.
36. STEYER, A., K.G. TORKAR, I. GUTIÉRREZ-AGUIRRE, M. POLJŠAK-PRIJATELJ (2011): High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 214(5), 392–398.
37. TATE, J. E., A.H. BURTON, C. BOSCHI-PINTO, U.D. PARASHAR, M. AGOCS, F. SERHAN, F. PALADIN (2016): Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin. Infect. Dis.* 62(2), 96–105.
38. THEUNS, S. (2015): Porcine rotavirus infections in Belgian piglets and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *Disertacija*. Ghent University, Ghent, Belgija

8.SAŽETAK

Utvrđivanje prisutnosti i proširenosti rotavirusa A u ljudi i različitim vrsta domaćih životinja na jednom obiteljskom gospodarstvu

Rotavirusi, a posebno vrsta *Rotavirus A* (RVA), široko su rasprostranjeni uzročnici crijevnih infekcija iz porodice *Reoviridae*. Iako se javljaju u različitim vrsta sisavaca i ptica, najznačajniji problem predstavljaju u intenzivnom uzgoju mlađih dobnih kategorija goveda i svinja, a primarni su uzrok i akutnog proljeva u djece do pet godina starosti. Rotavirusi pripadaju porodici virusa s dvolančanim i segmentiranim RNA genomom (*Reoviridae*) koji ponekad uvjetuje pojavu genomskog preslagivanja između humanih i životinjskih sojeva RVA, a time i nastanak novih emergentnih sojeva. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi prisutnost i proširenost rotavirusa A u različitim vrsta životinja, ljudi i okolišu na jednoj mikrolokaciji, u sklopu obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva u Sisačko-moslavačkoj županiji. Tijekom istraživanja uzorkovano je ukupno 117 uzoraka govedih, ovčjih, svinjskih, magarećih, konjskih, psećih i maćjih fecesa; devet uzoraka fecesa ljudi i tri uzorka vode. Metodom RT-PCR u stvarnom vremenu prisustvo RVA utvrđeno je u ukupno 21 uzorku (16,28%); 20 uzoraka fecesa životinja i jednom uzorku površinske vode. Distribucija pozitivnih uzoraka po vrstama značajno se razlikovala. Tako su pozitivni uzorci utvrđeni u 42,3% (11/26) pretraženih goveda, 30,8% (8/26) svinja te 14,3% (1/7) mačaka. Kod teladi u predtovu prevalencija RVA bila je izrazito visoka, čak 61,11% (11/18). U pretraživanom uzgoju ustanovljen je visok stupanj subkliničke infekcije, prevalencija infekcije RVA kod životinja bez proljeva iznosi 37,5% kod goveda i 30,8% kod svinja. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju uzoraka unutar kategorija pojedinih vrsta, sa šireg geografskog područja uz obaveznu genotipizaciju i utvrđivanje molekularnih značajki cijelog genoma različitih sojeva RVA. Jedino tako ćemo u skladu s načelom „Jedno zdravlje“ moći procijeniti njihov zoonotski potencijal.

Ključne riječi: Rotavirus A, RT-PCR u stvarnom vremenu, prevalencija, Obiteljsko poljoprivredno gospodarstvo, Hrvatska

9.SUMMARY

Presence and prevalence of rotavirus A in humans and different species of domestic animals on a single family farm

Rotaviruses, and in particular the species *Rotavirus A* (RVA), are widespread agents of intestinal infections. Although they occur in different mammalian and bird species, they are the most significant problem in the intensive rearing of calves and piglets, and are the primary cause of acute diarrhea in children up to five years of age. Rotaviruses belong to a family of viruses with the double-stranded and segmented RNA genome (*Reoviridae*), which sometimes causes the genomic rearrangement between human and animal RVA strains, and thus the emergence of new strains. The aim of this study was to determine the presence and prevalence of rotavirus A in different species of animals, humans and the environment at one microlocation within a family farm in Sisak-Moslavina County. During the study; a total of 117 samples of beef, sheep, pig, donkey, horse, dog and cat faeces were sampled, as well as nine samples of human feces and three samples of water. Real-time RT-PCR detected a total of 21 positive samples (16.28%). The distribution of positive samples varied significantly; 42.3% (11/26) of cattle samples, 30.8% (8/26) of pig samples and 14.3% (1/7) of feline samples presented positive results for RVA. In pre-fattening calves the prevalence of RVA was extremely high - 61.11% (11/18). A high rate of subclinical infection was also found on this farm; the prevalence of RVA infection in animals without diarrhea was 37.5% in cattle and 30.8% in pigs. Further research that will include larger number of samples within the categories of particular species, from a wider geographical area, as well as with the obligatory genotyping and molecular characterization of the whole genome of different RVA strains is needed. Only in this way will we be able to assess zoonotic potential of RVA in accordance with the principle of "One Health".

Key words: Rotavirus A, Real-time RT-PCR, Prevalence, Family Farm, Croatia

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23.8.1994. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Sunja te Srednju školu Petrinja, smjer opća gimnazija. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja pohađala sam i četiri stupnja Govorničke škole Ivo Škarić. Veterinarski fakultet u Zagrebu upisala sam 2013. godine. Na trećoj godini studija bila sam demonstrator na Zavodu za stočarstvo, a na četvrtoj u Knjižnici Veterinarskog fakulteta. Terensku stručnu praksu u okviru 12. semestra odradila sam u Veterinarskoj ambulanti Vetmed d.o.o u Stručcu. Odrasla sam i živim na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.