

Seroprevalencija ždrebećaka u Republici Hrvatskoj

Lukanec, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:707336>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

TEA LUKANEC

**SEROPREVALENCIJA ŽDREBEĆAKA U REPUBLICI
HRVATSKOJ**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: izv. prof. dr.sc. Zrinka Štritof

Članovi Povjerenstva:

1. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
2. Prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. Izv. prof.dr.sc. Zrinka Štritof
4. Doc. dr. sc. Josipa Habuš, zamjena

1 Sadržaj

1	Sadržaj.....	1
2	Uvod.....	3
3	Pregled dosadašnjih istraživanja	4
3.1	Etiologija	4
3.2	Epizootiologija.....	5
3.3	Patogeneza	6
3.4	Klinička slika.....	6
3.5	Komplikacije	8
3.5.1	Širenje infekcije.....	8
3.5.2	Purpura hemorrhagica	9
3.5.3	Miozitis.....	9
3.5.4	Agalakcija kobil.....	10
3.6	Dijagnostika.....	10
3.6.1	Bakteriološka pretraga.....	11
3.6.2	PCR – lančana reakcija polimeraze.....	12
3.6.3	Serološka pretraga	13
3.7	Diferencijalna dijagnostika.....	15
3.8	Liječenje	15
3.9	Cijepljenje.....	16
3.10	Profilaksa	17
4	Materijali i metode	19
5	Rezultati	19
6	Rasprava	22
7	Zaključci.....	24
8	Popis literature:	25
9	Sažetak	29

10	Summary	30
11	Popis korištenih kratica	31
12	Popis priloga.....	31
13	Životopis.....	32

2 Uvod

Ždrebećak je najvažnija i geografski najrasprostranjenija bakterijska bolest ekvida u svijetu uzrokovana bakterijom *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Prvi puta je opisana već 1251. godine, a opisao ju je Jordanus Ruffus (SELLON i LONG, 2007.), dok je 1888. utvrđeno da je upravo navedena bakterija uzročnik bolesti (SCHÜTZ, 1988.). Ždrebećak je akutna zarazna bolest koju karakterizira nagli nastup vrućice praćen upalom gornjih dišnih puteva (VAN DER KOLK i KROEZE, 2013.). Do infekcije dolazi oralnim ili nazalnim putem, direktnim ili indirektnim kontaktom. Inkubacija varira od nekoliko dana do nekoliko tjedana, a ovisi o virulenciji patogena, količini patogena te imunološkom statusu životinje prilikom infekcije. Iscjedak iz nosa u početku je serozan, a s napredovanjem bolesti postaje mukopurulentan. Uočava se edem i apscediranje limfnih čvorova, a najčešće su zahvaćeni submandibularni i retrofaringealni limfni čvorovi. Nakon rupture apscesa veličina limfnih čvorova se vrlo brzo smanjuje (SELLON i LONG, 2007.). Puknućem retrofaringelanih limfnih čvorova zbog anatomskeg smještaja dolazi do kontaminacije zračnih mjehura koji se pune gnojem evakuiranim iz limfnih čvorova. Ukoliko drenaža zračnih mjehura nije dostatna, dolazi do stvaranja hondroida u kojima se zadržava uzročnik, a konj ostaje izvor infekcije i do nekoliko godina.

Prema podacima švedske poljoprivredne zajednice ždrebećak je najčešće prijavljivana zarazna bolest konja u Švedskoj u periodu od 2013. do 2017. godine (<https://www.sva.se/en/animal-health/horses>). Prema istraživanju u SAD-u provedenom 2011. godine, od 201 konja pretraženog na respiratorne bolesti, 49 od njih je bilo pozitivno na uzročnika ždrebećaka (PUSTERLA i sur., 2011.). U Ujedinjenom Kraljevstvu, od siječnja do rujna 2019., bakteriološkom pretragom ili putem PCR-a, potvrđen je 281 slučaj ždrebećaka. (<https://www.aht.org.uk/disease-surveillance/surveillance-equine-strangles>).

Budući da se u Republici Hrvatskoj bolest ne prijavljuje nije poznato u kojim je dijelovima države bolest rasprostranjena, koliko učestalo se javljaju klinički slučajevi niti u kojem obliku. U ovom istraživanju serološki je pretražen 291 serum konja porijeklom iz osam hrvatskih županija. Za dokaz prisutnosti protutijela na uzročnika, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, korišten je imunoenzimski test (ELISA). Na taj način

će se utvrditi seroprevalencija ždrebećaka u pojedinim područjima. Dobiveni podatci će po prvi puta dati uvid u rasprostranjenost infekcije u konja u različitim dijelovima Hrvatske i stupanj rizika od zaražavanja konja u pojedinim područjima.

3 Pregled dosadašnjih istraživanja

3.1 Etiologija

Streptococcus equi subsp. *equi* je beta-hemolitična, gram –pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija kuglastog ili ovalnog oblika (NAGLIĆ i sur. 2005.). Bakterija ima sposobnost razvijanja mnoštva antifagocitnih faktora i mehanizama koji ometaju urođeni imunski odgovor i pogoduju njenoj virulenciji. Tako u faktore virulencije ubrajamo kapsulu građenu od hijaluronske kiseline, hijaluronidazu, streptolizin S, streptokinazu, imunoglobulin G, pirogene egzotoksine, peptidoglikane i antifagocitni M protein (SeM). Hijaluronska kapsula se smatra odgovornom za nemogućnost neutrofila da fagocitiraju bakteriju te je nužna za djelovanje M proteina. Streptolizin S odgovoran je za β -hemolizu. Pirogeni egzotoksini koje producira *S. equi* nespecifično stimuliraju T- stanice i otpuštanje upalnih citokina što rezultira odgovorom akutne faze. M protein je antifagocitna molekula koja se nalazi na vanjskoj površini stijenke bakterije i svojim specifičnim mehanizmom vezanja proteina na sebe sprečava fagocitozu bakterije (SELLON i LONG, 2007.). Uzgoj se vrši na krvnom agaru, a oskudno će rasti na hranjivim podlogama bez krvnog seruma. Kolonije na krvnom agaru tvore beta-hemolizu, a u bujonu obilni sluzavi pahuljičasti talog (NAGLIĆ i sur., 2005.). Uzročnik će preživjeti u vodi 4-6 tjedana, međutim ne i u fecesu ili tlu. Iako su studije o preživljavanju bakterije, sprovedene u laboratorijskim uvjetima, pokazale dugotrajnije preživljavanje (JORM, 1992.), novije istraživanje provedeno u vanjskim uvjetima pokazalo je smrt uzročnika koji se nalazi u tlu ili na ogradi već kroz 1-3 dana (WEESE i sur., 2009.). *S. equi* je osjetljiva na bakteriocine koje proizvode druge bakterije u okolišu te neće lako preživjeti u prisutnosti drugih bakterija tla (BOYLE, 2018.).



Slika 1. *Streptococcus equi* subsp. *equi* na krvnom agaru

3.2 Epizootiologija

Izvor infekcije mogu predstavljati naizgled zdravi konji koji su u fazi inkubacije, a pretpostavka je da uzročnika izlučuju fiziološkim sekretom iz nosa. S druge strane, potencijalni izvor su i konji koji su ozdravili, odnosno ne pokazuju kliničke znakove, međutim mogu izlučivati uzročnika još najmanje 6 tjedana. U otprilike 10% oboljelih životinja javlja se kronični empijem zračnog mjehura. Ukoliko ne dođe do drenaže istog, purulentni sadržaj opstaje unutar mjehura, zgušnjava se i tvori tzv. hondroide koji sadrže uzročnika. Hondroidi se unutar zračnog mjehura mogu zadržati i do nekoliko godina bez da životinja pokazuje kliničke znakove, tek sporadično kašlje ili ima iscjedak iz nosnica. Na taj način životinje koje su preboljele ždrebećak zapravo ostaju nevidljivi, subklinički izvori infekcije (SWEENEY i sur., 2005). Prijenos uzročnika događa se direktnim ili indirektnim kontaktom prijemljivih životinja s purulentnim iscjetkom iz limfnih čvorova, nosa ili oka oboljelih životinja. Direktni prijenos podrazumijeva međusobni kontakt između konja njuškanjem ili dodirivanjem glave. Indirektni prijenos odvija se prilikom dijeljenja kontaminiranog prostora, pojila, hrane, brnjica, uzdi ili pak preko odjeće i opreme veterinarima ili vlasnika (BOYLE, 2018.). Ulazna vrata predstavljaju sluznice nosne i usne šupljine. Sam naziv bolesti potječe od najučestalije inficiranih i oboljelih životinja, a to je ždrebad. Smatra se da je to posljedica veće osjetljivosti sluznica mlađih životinja. Najčešće obole životinje u dobi od dvije do tri godine, iako postoji mogućnost obolijevanja i starijih životinja čemu najčešće prethode uvjeti izrazito narušene otpornosti (CVETNIĆ, 2008). Iako se smatra da od ždrebećaka obolijevaju isključivo ekvidi, važno je napomenuti slučaj iz Ujedinjenog Kraljevstva gdje je iz uzorka limfnog čvora zlatnog retrievera izoliran upravo *Streptococcus equi* subsp. *equi* kao

uzročnik limfadenopatije u psa (LADLOW i sur., 2006.). Upravo iz tog razloga potrebno je provesti detaljnija istraživanja o drugim vrstama životinja kao izvorima infekcije ili pak preispitati tezu o patogenosti bakterije isključivo za ekvide.

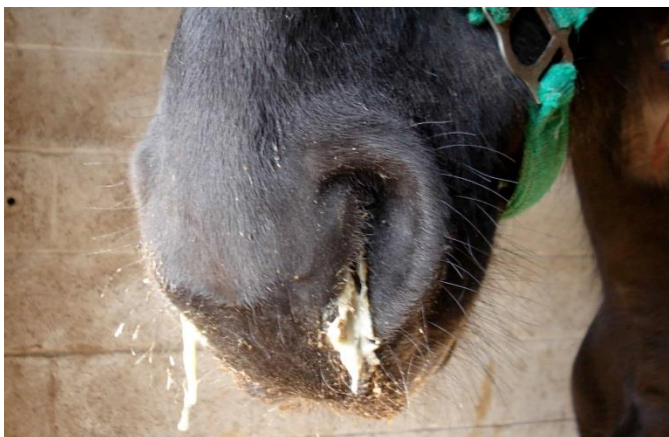
3.3 Patogeneza

Nakon ulaska oralnim ili nazalnim putem, uzročnik se veže za stanice jezičnih, nepčanih, faringealnih i tubalnih tonzila (TIMONEY i sur., 2008.). Već nekoliko sati po infekciji bakterija prodire unutar epitelnih stanica i subepitelnih tonzilarnih folikula te se zbog toga teško nalazi na samoj površini sluznice. Unutar nekoliko sati dolazi do translokacije bakterija u mandibularne i retrofaringealne limfne čvorove koji dreniraju faringealnu i tonzilarnu regiju (BOYLE i sur., 2018.). Nakon reakcije između komplementa i uzročnika dolazi do nakupljanja velikog broja polimorfonuklearnih neutrofila (MUKHTAR i TIMONEY, 1988.). Nemogućnost neutrofila da fagocitiraju i ubiju uzročnika pripisuje se kapsuli tvorenoj od hijaluronske kiseline i antifagocitnom SeM proteinu te drugim manje poznatim obrambenim mehanizmima bakterije (TIMONEY i sur., 2014.). Inokulacija s manje od 10^6 bakterija u mililitru neće uzrokovati infekciju jer će takav manji broj bakterija biti uklonjen putem mukocilijarnog klirensa. Što je veći broj inokuliranih bakterija, kraći je period inkubacije i javlja se teži oblik bolesti. Inkubacija obično traje 3-14 dana. Širenje uzročnika putem nosnog iscjetka obično započinje 2-3 dana nakon početka vrućice i u većine životinja potraje 2-3 tjedna (BOYLE i sur., 2018.). S druge strane, izlučivanje uzročnika može potrajati i puno duže ako je došlo do infekcije zračnih mjehura ili sinusa (CHANTER i sur., 1998.; NEWTON i sur., 1997a; NEWTON i sur., 1997b). Stariji konji s rezidualnim imunitetom, ždrebad s majčinskim protutijelima u opadanju te cijepljene životinje slabije su osjetljivi na uzročnika i mogu razviti samo blagi oblik bolesti – kataralni ili atipični ždrebećak. Važno je napomenuti da će takve životinje izlučivati virulentnog uzročnika koji može u osjetljivijih životinja izazvati teži oblik bolesti (SHEORAN i sur. 1997.).

3.4 Klinička slika

Nagli nastup vrućice praćen faringitisom i posljedičnim formiranjem apscesa submandibularnih i retrofaringealnih limfnih čvorova karakteristika je infekcije bakterijom *S.equi* subsp. *equi*. Vrućica može u nekim slučajevima prelaziti čak i

42°C (WALLER, 2014.), a može ostati prisutna i do puknuća limfnih čvorova (BOYLE i sur., 2018.). Životinje su letargične, nerijetko odbijaju hranu i vodu, imaju iscjedak iz nosa ili drže glavu u netipičnoj poziciji. Limfadenopatija najčešće uključuje submandibularne i retrofaringealne limfne čvorove, međutim zahvaćeni mogu biti i parotidni i cervikalni limfni čvorovi. Otekline su nejasno ograničene, napete, temperirane i bolne. Zahvaćenost parotidnih i retrobulbarnih limfnih čvorova može uzrokovati otečenje oko očiju i na taj način privremeno blokirati vid. Povećani limfni čvorovi ždrijelnog područja mogu blokirati gornje dišne puteve, dovesti do privremene hemiplegije larinksa ili pak disfagije. Kod težih slučajeva indicirano je učiniti traheotomiju. Također može doći do upale sluznica oka i nosa iz kojih se cijedi purulentni iscjedak koji sadrži uzročnika. Formirani apscesi obavijeni su fibroznom ovojnicom koja u pravilu puca između 7 dana i 4 tjedna od nastanka infekcije. Apsces može rupturirati u dišne puteve ili zračni mjehur ili pak kroz kožu, što je karakteristično za submandibularne limfne čvorove. Ukoliko su prisutne velike količine iscjetka iz usta ili nosa prilikom hranjenja, kašljanja ili pri nižem držanju glave opravdano je posumnjati na empijem zračnog mjehura (BOYLE i sur., 2018.). Kašalj se ne javlja toliko često, no ukoliko ga životinja razvije on je u početku blag i vlažan, a kako bolest napreduje postaje sve teži i produktivan (SELLON i LONG, 2007.).



Slika 2. Purulentni iscjedak iz nosa

3.5 Komplikacije

Otprilike 20% konja oboljelih od ždrebećaka razvije neki oblik komplikacije što uvelike utječe na stopu smrtnosti. Komplikacije uključuju širenje infekcije u druge dijelove tijela, imunoposredovane procese te agalaksiju u kobila.

3.5.1 Širenje infekcije

S. equi se može proširiti u bilo koji dio tijela – hematogeno, limfogeno, zbog blizine žarišta ili pak aspiracijom purulentog sadržaja s uzročnikom. Takav metastatski oblik bolesti se još naziva i "putujući ždrebećak". Najčešća mjesta metastaziranja su pluća, mezenterij, jetra, slezena, bubrezi i mozak. Do pritiska na dušnik dolazi uslijed metastaziranja na medijastinalne limfne čvorove, a nerijetko dolazi i do gnojne bronhopneumonije. Zahvaćenost mezenterijalnih limfnih čvorova može biti praćena ascitesom. Širenje infekcije na sinuse i zračne mjehure također predstavlja značajnu komplikaciju, s obzirom na to da takvi konji mogu ostati dugotrajni izvori infekcije za druge životinje. Od rjeđih komplikacija još se mogu javiti miokarditis, endokarditis, panoftalmitis, periorbitalni apscesi, apscesi mozga, ulcerativni keratitis, septični artritis (SELLON i LONG, 2007.). Liječenje takve proširene infekcije uključuje dugotrajnu antimikrobnu terapiju, lokalnu terapiju te drenažu dostupnih apscesa (BERLIN i sur.,2013.;PUSTERLA i sur., 2007.).



Slika 3. Rupturirani limfni čvorovi konja

3.5.2 Purpura hemorrhagica

Purpura hemorrhagica je imunoposredovano stanje čija patogeneza nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se da nastaje kao posljedica odlaganja imunih kompleksa na stijenke krvnih žila. Važno je napomenuti da do takvog stanja ne dolazi isključivo u prisutnosti *S. equi* u organizmu – i neki drugi patogen može polučiti isti imunosni odgovor inficiranog organizma. Radi se o aseptičnom nekrotizirajućem vaskulitisu uslijed kojeg dolazi do edema, petehijalnih i ekhimotičnih krvarenja. Edemi se javljaju na glavi, trupu i ekstremitetima, a mogu biti toliko teški da uzrokuju guljenje kože na tim područjima. Osim navedenog, vaskulitis može zahvatiti i gastrointestinalni trakt, pluća i mišiće što rezultira intususcepcijom tankog crijeva (DUJARDIN, 2011.), respiratornim poteškoćama i bolnošću mišićja. Liječenje se provodi kortikosteroidima, antibioticima, nesteroidnim protuupalnim lijekovima te potpornom terapijom koja uključuje intravensku tekućinsku terapiju, hidroterapiju i stavljanje povoja. *Purpura hemorrhagica* je ozbiljna komplikacija koja nerijetko završava fatalno (BOYLE i sur., 2018.).



Slika 4. Oguljena koža kao posljedica purpure

3.5.3 Miozitis

Kao posljedica infekcije sa *S. equi* zabilježena su tri tipa miopatija: infarkt mišićja (KAESE i sur.,2005.), rabdomioliza s akutnom mionekrozom (SPONSELLER i sur.,2005.) i rabdomioliza s progresivnom atrofijom mišića (DURWARD-AKHURST i VALBERG, 2017.).

Infarkti mišićja se interpretiraju kao teška manifestacija purpura. Javlja se ukočenost mišića, hromost te povišene koncentracije enzima mišićja u kombinaciji s abdominalnom bolnošću i potkožnim edemima. Na histopatološkoj pretrazi uočavaju se koagulacijske nekroze mišićja s infarktima. Indiciran je agresivan tretman kortikosteroidima i antibioticima, međutim ishod je bez obzira na terapiju neizvjestan.

Rabdomioliza s akutnom mionekrozom očituje se ukočenim hodom i ležanjem te edemima. Mehanizam nastanka nije poznat, međutim smatra se da do rabdomiolize dolazi zbog aktivacije upalne kaskade slične sindromu streptokoknog toksičnog šoka ili pak zbog direktnog toksičnog učinka bakterije *S. equi* na mišićno tkivo.

Rabdomioliza s izraženom mišićnom atrofijom rezultira generalnom slabošću i izrazito progresivnom atrofijom glutealne i epaksijalne muskulature. Koncentracija mišićnih enzima u serumu je povišena, a biopsijom tkiva je utvrđena kronična aktivna rabdomioliza s regeneracijom (VALBERG i sur.,1996.). Ukoliko se životinja oporavi, povratak normalne mišićne mase je moguć (BOYLE i sur.,2018.).

3.5.4 Agalaksija kobila

Mamarne žlijezde su normalne, no smatra se da se agalaksija javlja sekundarno kao posljedica vrućice, anoreksije i letargije zbog primarne infekcije sa *S. equi*. Stanje nije opasno po život, ali može onemogućiti adekvatnu produkciju mlijeka za ždrebac (SELLON i LONG, 2007.).

3.6 Dijagnostika

Nekoliko je mogućih načina provođenja dijagnostike ždrebećaka –bakteriološka, serološka i molekularna pretraga. Više je načina na koji se može prikupiti uzorak, a prednosti i nedostaci svakog navedene su u Tablici 1. Općenito govoreći, dokaz uzročnika putem molekularnih metoda i/ili izdvajanje na hranjivoj podlozi relativno su brze metode koje omogućuju utvrđivanje akutnog izbijanja bolesti te samim time pravodobno djelovanje u smislu prevencije širenja bolesti. S druge strane, serološke pretrage pogodnije su za utvrđivanje seroprevalencije, odnosno potencijalnih različitih stanja u kojima mogu biti testirane životinje, a koja se s obzirom na titar različito interpretiraju (Tablica 2.).

UZORAK	PREDNOST	NEDOSTATAK
<ul style="list-style-type: none"> Aspirat zrelog, apscediranog limfnog čvora 	<ul style="list-style-type: none"> Veliki broj bakterija 	<ul style="list-style-type: none"> Uznapredovali stadij bolesti
<ul style="list-style-type: none"> Obrisak nosnica 	<ul style="list-style-type: none"> Jednostavnost uzorkovanja 	<ul style="list-style-type: none"> Potreban mukopurulentni iscjedak
<ul style="list-style-type: none"> Obrisak nazofarinksa 	<ul style="list-style-type: none"> Jednostavnost uzorkovanja 	<ul style="list-style-type: none"> Mogućnost lažno negativnih (još se ne izlučuje uzročnik ili se tek povremeno izlučuje iz zračnog mjehura)
<ul style="list-style-type: none"> Ispirak nazofarinksa 	<ul style="list-style-type: none"> Jednostavnost uzorkovanja Uzorkovanje veće površine sluznice Pokazao se osjetljivijim od obriska nazofarinksa 	<ul style="list-style-type: none"> Mogućnost lažno negativnih (još se ne izlučuje uzročnik ili se tek povremeno izlučuje iz zračnog mjehura)
<ul style="list-style-type: none"> Ispirak zračnog mjehura 	<ul style="list-style-type: none"> Najbolji za detekciju kliconoštva 	<ul style="list-style-type: none"> Potrebna specijalna oprema i iskustvo za ulazak u zračni mjehur Vremenski zahtjevnije Mogućnost lažno negativnih ako limfni čvor nije rupturirao u zračni mjehur

Tablica 1. Usporedba načina uzorkovanja

3.6.1 Bakteriološka pretraga

Bakteriološka pretraga uzoraka vrši se na Columbia CNA agaru s dodatkom kolistina i nalidiksične kiseline i konjske ili ovčje krvi (BOYLE i sur., 2018.). Budući da je *S. equi* β-hemolitični streptokok na krvnom agaru će uzrokovati potpunu lizu eritrocita. Problem može predstavljati *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, bakterija koja obitava na

koži konja kao komenzal, no isto tako može uzrokovati infekcije različitih organskih sustava. Naime, njene kolonije na hranjivoj podlozi mogu izgledati gotovo isto kao i kolonije bakterije *S. equi* (sluzave kolonije boje meda, okružene zonom beta hemolize). Upravo iz tog razloga potrebno je izdiferencirati o kojoj vrsti bakterije se radi. Razlikovanje tih dviju bakterija bazira se na sposobnosti fermentacije šećera – *S. zooepidemicus* fermentira sorbitol i laktozu za razliku od *S. equi* koja nema tu sposobnost. Za dobivanje rezultata bakteriološke kulture potrebno je minimalno jedan do dva dana, ali je široko dostupan i pogodan način dijagnostike u fazi aktivnog kliconoštva. S druge strane, ukoliko su uzorci uzeti u fazi inkubacije, ranoj kliničkoj manifestaciji (uzročnik se na sluznicama pojavljuje nakon 24-48 sati nakon pojave vrućice) ili u vrijeme konvalescentnog kliconoštva (mali broj prisutnih bakterija), postoji mogućnost lažno negativnih rezultata (BOYLE i sur., 2018.). Iako se bakteriološka pretraga smatrala zlatnim standardom u dijagnostici ždrebećaka, studije s naglaskom na osjetljivost takve vrste testiranja dovele su do suprotnog zaključka (VALBERG i sur.,1996.;BOYLE i sur.,2012.;LINDAHL i sur.,2013.;BOYLE i sur.,2016.). Naime, pokazalo se da je PCR otprilike tri puta osjetljivija metoda od uzgoja na podlozi (NEWTON i sur.,2000.;TIMONEY i ARTIUSHIN, 1997.). Pozitivan rezultat molekularne pretrage uvijek je potrebno provjeriti bakteriološkom pretragom jer je izdvajanje bakterije dokaz da se radi o živom uzročniku te da pretražena životinja predstavlja izvor infekcije za druge životinje. Izdvajanje bakterije također je neophodan preduvjet u provođenju epizootioloških istraživanja.

3.6.2 PCR – lančana reakcija polimerazom

PCR je molekularna metoda dijagnostike koja se bazira na detekciji i umnažanju SeM gena koji je odgovoran za stvaranje antifagocitnog M proteina uzročnika te na taj način potvrđuje prisutnost uzročnika u ispitivanom uzorku. Mana ove metode dijagnostike leži u tome da PCR neće razlikovati žive od mrtvih organizama. Naime, DNK uzročnika može ostati prisutna u zračnom mjehuru još tjednima nakon nestanka živih organizama. Upravo iz tog razloga uz PCR se preporučuje učiniti i bakteriološku pretragu kako bi se sa sigurnošću potvrdilo ili isključilo kliconoštvo u pretražene životinje. S druge strane, mukocilijarni klirens će ukloniti svu DNK iz područja nosa i ždrijela pa ne postoji opasnost od lažno pozitivnih rezultata uzoraka uzetih iz tih područja (SWEENEY i sur., 2005.). Kao optimalnu metodu dijagnostike

preporučuje se endoskopom navođeno uzimanje ispirka zračnog mjehura s obzirom na to da je osim samog uzorkovanja moguće vidjeti i eventualne makroskopske promjene u samom mjehuru kao što su upala, empijem ili prisutnost hondroida (BOYLE i sur., 2108.).

3.6.3 Serološka pretraga

ELISA je serološka metoda dijagnostike kojom se utvrđuje prisutnost protutijela za određeni antigen iz krvnog seruma životinje. Za *Streptococcus equi* subsp. *equi*, to se odnosi na prisutnost protutijela za SeM površinski protein te za antigen A i antigen C.

Titar SeM protutijela doseže svoj maksimum otprilike 5 tjedana nakon izlaganja uzročniku, a ostaje visok do 6 mjeseci. Serološke vrijednosti SeM- specifičnog titra ne pokazuju stupanj zaštićenosti životinje, niti se pomoću njih može utvrditi aktivna infekcija ili kliconoštvo. Titar protutijela s vremenom opada, a konji koji su primali antibiotsku terapiju imaju smanjen imunski odgovor i prijemljiviji su za reinfekciju (PICHE, 1984.). Titar SeM-specifičnih protutijela može se koristiti za dokazivanje imunoposredovanog vaskulitisa povezanog sa *S. equi*, zatim dokaz "putujućeg ždrebećaka" ili nedavne infekcije (četverostruko ili veće povećanje titra na parnim serumima uzetim u razmaku od 10 dana). Važno je naglasiti da postoji mogućnost lažno pozitivnih rezultata ako se u serumu nalaze protutijela za M površinski protein bakterije *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SzM) koja je usko srodna s bakterijom *S. equi* subsp. *equi* (BOYLE i sur., 2018.).

Kombinirana antigen A i antigen C indirektna ELISA (iELISA) metoda je u kojoj se paralelno izvode dva testa, a svaki je specifičan za određeni protein SeM protutijela koji je specifičan za *S. equi* subsp. *equi*. Ukoliko bilo koji od njih ili oba ispadnu pozitivni životinja se smatra pozitivnom. Ovakav način testiranja pokazao se jednako osjetljivim, ali više specifičnim od prethodno opisanog (ROBINSON i sur., 2013.). Kombinirani iELISA test pogodan je za rano utvrđivanje infekcije (već dva tjedna od kontakta s uzročnikom) te za otkrivanje potencijalnih kliconoša (BOYLE i sur., 2018.).

Rezultat	Titar	Interpretacija
Negativan		Nisu detektirana SeM specifična protutijela. Konj nije izložen uzročniku niti je cijepljen ili je tek nedavno izložen uzročniku (<7 dana).
Slabo pozitivan	1:200 – 1:400	SeM specifična protutijela detektirana na vrlo niskoj razini. Ovakav rezultat može biti posljedica prisutnosti rezidualnih protutijela, protutijela zbog nedavne izloženosti uzročniku ili cijepljenja u daljoj prošlosti. Preporuča se ponovno testiranje za 7-14 dana.
Umjereno pozitivan	1:800 – 1:1600	SeM specifična protutijela detektirana na srednjoj razini. Ovakav titar protutijela nalazi se u konja 2 do 3 tjedna nakon izloženosti uzročniku ili ako je infekcija nastupila prije 6 mjeseci do dvije godine.
Visoko pozitivan	1:3200 – 1:6400	SeM specifična protutijela detektirana na visokoj razini. Ovakav titar protutijela nalazi se u konja 4 do 12 tjedana nakon infekcije ili cijepljenja. Cijepljenje je kontraindicirano u konja s visokim titrom protutijela (> 1:1600)
Izrazito pozitivan	>1:12,800	SeM specifična protutijela detektirana na vrlo visokoj razini. Ovakav visoki titar nalazi se kod konja sa metastatskim apscesima ili purpustom nakon izloženosti uzročniku ili nakon cijepljenja.

Tablica 2. Interpretacija SeM specifičnog testa (ELISA)

3.7 Diferencijalna dijagnostika

Respiratorne bolesti nerijetka su pojava u konja. Najčešće se očituju unilateralnim i bilateralnim iscjetkom iz nosa. Diferencijalno dijagnostički potrebno je isključiti uzročnike rinitisa, sinusitisa, empijema zračnog mjehura te kroničnog bronhitisa, bilo da su oni virusne ili bakterijske etiologije (influenza, rinopneumonitis, *Rhodococcus equi*). *Actinomyces denticoles* uzrokuje mandibularnu limfadenopatiju i klinički može izgledati poput ždrebećaka (ALBINI i sur., 2008.). *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Burkholderia pseudomallei* i *Rhodococcus equi* su uzročnici koji kao i *S. equi* mogu uzrokovati apscediranje unutrašnjih organa (VAN DER KOLK i KROEZE, 2013.).

3.8 Liječenje

Tijek liječenja ždrebećaka ovisi o stadiju bolesti u kojem se životinja nalazi. Pristup je različit za životinje koje imaju ranu kliničku manifestaciju u usporedbi s onima kod kojih se razvila limfadenopatija odnosno apscediranje limfnih čvorova.

Kod konja s ranom kliničkom manifestacijom (letargija, vrućica) indicirana je primjena antibiotika kako bi se spriječilo apscediranje limfnih čvorova. S obzirom na to da je vrijeme infekcije najčešće nepoznato teško je odrediti koliko dugo životinja treba primati antibiotik. Ukoliko se prerano prestane s terapijom moguće je da dođe do kontraefekta i trajanje bolesti se produži. Upotreba antibiotika također je indicirana kod duboke limfadenopatije, metastatskog apscediranja, imunoposredovanog vaskulitisa te za lokalnu primjenu kod infekcije zračnog mjehura. Antibiotici se nikako ne bi trebali koristiti preventivno kod eventualno izloženih životinja.

Životinje kod kojih je uočeno povećanje limfnih čvorova trebaju isključivo potpurnu terapiju u vidu odmaranja, smještaja u suhoj, toploj i prozračenoj staji. Potrebno im je osigurati vlažnu, mekanu i kvalitetnu prehranu. Apliciranje toplih obloga na područje otečenih limfnih čvorova može ubrzati proces sazrijevanja istih. Antibiotici u ovom slučaju mogu samo produžiti trajanje bolesti s obzirom na to da će usporiti proces sazrijevanja apscesa. Ukoliko apscedirani limfni čvorovi ne puknu spontano moguće je učiniti kiruršku drenažu istih, no ključno je da čvor bude u potpunosti zreo

te da je ventralni dio čvora stanjen. Ukoliko se kirurškoj drenaži pristupi prije nego što limfni čvor sazrije postoji rizik od upravo suprotnog efekta – minimalna drenaža čvora te njegovo daljnje oticanje. Rupturirani apsces uputno je ispirati na dnevnoj bazi 3-5% otopinom povidon joda sve dok iscjedak ne nestane. Nesteroidni protuupalni lijekovi (flunixin meglumin, fenilbutazon) svojim djelovanjem će sniziti vrućicu, umanjiti bolove te oteklinu na mjestu apscediranja što može pozitivno utjecati na uzimanje hrane i vode. U slučajevima kada apscesi postanu toliko veliki da uzrokuju opstrukciju dišnih puteva i posljedično respiratorni distress moguća je primjena antibiotika s ciljem smanjivanja veličine apscesa. Antibiotik izbora je penicilin, a zabilježena je rezistencija na gentamicin i enrofloxacin. U rjeđim slučajevima na životinji je potrebno izvesti traheotomiju te postaviti traheostomu. Tada je indicirana sistemska primjena antibiotika kao preventiva sekundarnih bakterijskih infekcija donjih dišnih puteva. Potencijalna terapija po potrebi uključuje i intravensku primjenu tekućina te nazogastričnu sondu.

Kod empijema zračnog mjehura indicirane su višestruke lavaže uvođenjem katetera u mjehur. Za ispiranje se može koristiti izotonična fiziološka otopina ili polionske tekućine nakon čije primjene je potrebno učiniti drenažu bilo spuštanjem glave životinje ili upotrebom usisne pumpe navođene endoskopom. Na isti način moguća je i topikalna primjena antibiotika. Jedan od načina topikalne aplikacije antibiotika je i primjena mješavine želatine i penicilina koji je opisan od strane VERHEYENA i suradnika (2000.). Prednost ovakvog oblika antibiotika jest u tome što će se želatinozna masa duže zadržati na potrebnom mjestu djelovanja za razliku od tekućine. Lokalna primjena 20% otopine acetilcisteina reducira gustoću sluzi koja se producira u zračnom mjehuru te na taj način potiče drenažu. U slučajevima kada je došlo do formiranja hondroida u zračnom mjehuru moguća je njihova evakuacija pomoću endoskopa. Ukoliko su hondroidi preveliki za vađenje endoskopom moguće je njihovo otapanje pomoću prije navedenih tekućina kako bi se izbjegao kirurški zahvat (BOYLE i sur., 2018.).

3.9 Cijepljenje

Trenutno su na tržištu dostupne dvije vrste cjepiva- atenuirana i inaktivirana. Atenuirano, živo cjepivo dostupno na europskom tržištu je Equilis StrepE (BOYLE i sur., 2018.). Cjepivo je primjenjivo na ždrebadi od četiri mjeseca starosti pa nadalje.

Aplikacija se provodi submukozno u području gornje usne. Indicirano je cijepiti konje u kojih postoji jasan rizik od infekcije bakterijom *S. equi* zbog kontakta s drugim konjima (prisustvovanje natjecanjima, sajmovima), a u svrhu smanjivanja kliničkih znakova i pojave apscesa limfnih čvorova. Primovakcinacija provodi se dvokratno s razmakom od četiri tjedna, a uputno je nadocjepljivanje svaka tri mjeseca kako bi se zadržala odgovarajuća imunost. Budući da se odgovarajući imunitet postiže tek po završetku primarnog cijepjenja, provođenje istog u vrijeme izbijanja bolesti neće imati željenog učinka, odnosno neće pružiti adekvatnu zaštitu. Vakcina se ne smije upotrebljavati u gravidnih kobila i kobila u laktaciji (EUROPSKA AGENCIJA ZA LIJEKOVE, 2014.). Nedostatak ovog cjepiva je taj što imunost traje samo tri mjeseca i što se cijepni soj bakterije ni na koji način ne može razlikovati od prirodnog uzročnika (BOYLE i sur., 2018.).

StrepvaxII inaktivirano je cjepivo dostupno samo na američkom tržištu. Može se primjenjivati na svim starosnim skupinama. Aplikacija cjepiva vrši se intramuskularno, a imunosni odgovor nastupa za 7-10 dana nakon cijepjenja. Protokol uključuje trokratno cijepjenje s razmakom od tri tjedna nakon čega slijedi revakcinacija na godišnjoj razini. Istraživanje koje su 1991. proveli HOFFMAN i sur. pokazalo je da je ovo cjepivo djelotvorno samo u 50% slučajeva (BOYLE i sur., 2018.)

Nuspojave oba cjepiva uključuju otečenje na mjestu aplikacije, a rjeđe se očituju u obliku sindroma *purpura hemorrhagica*.

3.10 Profilaksa

Najučinkovitija profilaksa jest provođenje biosigurnosnih mjera na farmi te u radu sa životinjama. Svaka nova životinja koja se uvodi na farmu treba se staviti u karantenu na period od minimalno tri tjedna te se podvrgnuti testiranju (bakteriološka pretraga, PCR, endoskopija) kako bi se utvrdio status s obzirom na *S. equi*. Kroz tri tjedna boravka u karanteni uzorci za testiranje uzimaju se tri puta tjedno. Kompletno osoblje koje radi sa životinjama potrebno je adekvatno educirati o bolesti i njezinim načinima širenja kako bi se izbjegao prijenos uzročnika. Redovito održavanje staja i opreme u vidu čišćenja i adekvatne dezinfekcije također je izuzetno važna stavka u

prevenciji bolesti. Česti problem na farmama je nedostatak prostora za adekvatnu izolaciju. U sezoni parenja, sajмова ili sportskih događanja kontrola životinja je otežana zbog učestalog premještanja i kontakta s drugim životinjama. U mnogim zemljama, pa tako i u Hrvatskoj, ždrebećak nije kontroliran zakonskim odredbama što uvelike pridonosi smanjenom interesu za kontrolu i dijagnostiku bolesti.

Prilikom izbivanja bolesti biosigurnosne mjere trebale bi se održavati na najvišoj mogućoj razini. Premještanje i dovođenje životinja na imanje treba izbjegavati. Potrebno je odvojiti bolesne i zdrave životinje i identificirati potencijalne subkliničke kliconoše kako bi se spriječio prijenos bolesti između životinja. Konji se mogu grupirati u tri grupe – grupa u kojoj su konji koji pokazuju jedan ili više kliničkih znakova koji idu u prilog ždrebećaku, zatim grupa koja je bila u direktnom ili indirektnom kontaktu sa životinjama iz prve grupe te treća grupa koja niti pokazuje kliničke znakove niti je bila u bilo kakvom kontaktu s inficiranim životinjama. Životinjama iz posljednje dvije grupe uputno je svakodnevno barem jednom mjeriti rektalnu temperaturu kako bi se na vrijeme, prije početka izlučivanja uzročnika, moglo intervenirati i premjestiti ih u drugu grupu. Za svaku grupu konja potrebno je imati posebnu opremu kako ne bi došlo do indirektnog prijenosa. Ako je na raspolaganju dovoljan broj ljudi svaka grupa treba imati vlastito osoblje. Ako to nije moguće, osoblje uvijek treba započeti s radom prvo kod zdravih životinja, a potom prijeći na potencijalno inficirane i inficirane. Preporučuje se i zaštitna odjeća za osoblje koja će se po prestanku bolesti neškodljivo uništiti. Nakon oporavka životinja važno je utvrditi je li došlo do infekcije zračnog mjehura, odnosno jesu li konji ostali kliconoše unatoč kliničkom ozdravljenju. Životinje treba testirati tri tjedna nakon što su se povukli klinički znakovi, odnosno tri tjedna nakon zadnje primjene antibiotika ukoliko su bili liječeni. Preporučuje se učiniti endoskopsku lavažu zračnog mjehura i qPCR. Karantenu je potrebno nastaviti još tri tjedna nakon ozdravljenja posljednje bolesne životinje i nakon što su sve jedinke dale negativan rezultat na testiranju. Važno je imati na umu da životinje mogu ostati infektivne i do 6 tjedana nakon nestanka kliničkih znakova (BOYLE i sur., 2018.).

Nakon prestanka bolesti u stajama gdje su boravili bolesni konji važno je provesti adekvatne zoohigijenske mjere. Sav organski otpad (otpaci od hrane, stelja, feces, voda) potrebno je ukloniti i kompostirati na udaljenom mjestu. Sve površine u stajama potrebno je natopiti odgovarajućim dezinficijensom, pustiti da se osuši,

isprati i ponoviti postupak ukoliko je moguće. Idealno trajanje odmora objekta je četiri tjedna (SELLON i LONG, 2007.).

4 Materijali i metode

U istraživanju su serološki pretraživani serumi konja iz osam hrvatskih županija u kojima boravi najveći broj konja. Sve županije koje broje manje od 600 konja isključene su iz istraživanja. Kako bi uzorak bio reprezentativan iz svake županije pretraženo je 2% od ukupnog broja konja u toj županiji, a kako bi se omogućilo nepristrano pretraživanje najveći broj testiranih jedinki s istog imanja je bio deset. Zabilježeni su pasmina, spol i dob pretraživanih konja. Serumi su pretraživani indirektnim imunoenzimnim testom (iELISA). Indirektni imunoenzimni test rabljen u ovom istraživanju temelji se na detekciji specifičnih protutijela za N-terminalni fragment proteina SEQ_2190 (antigen A) i specifičnih protutijela za N-terminalni fragment proteina SeM (antigen C) bakterije *Streptococcus equi* subsp. *equi* (ROBINSON i sur., 2013.).

5 Rezultati

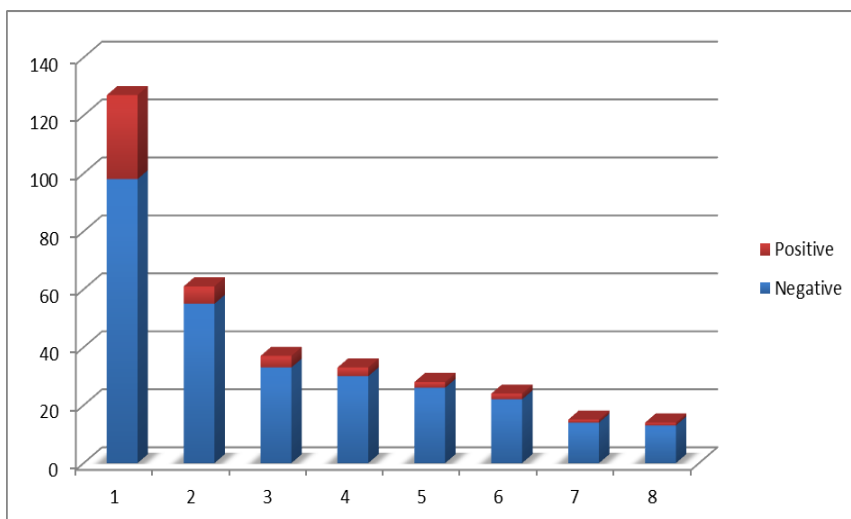
Ukupno je pretražen 291 uzorak seruma sa 127 imanja. Minimalan broj uzoraka iz jedne županije je bio 13, a maksimalan 98. Pretraživana populacija sastojala se od 214 (73,54%) kobila i 77 (26,46%) kastrata/pastuha. Budući da nije bilo moguće prikupiti podatke o pasmini za veliki broj uzoraka, životinje su razvrstane u dvije skupine: hladnokrvne, u koju je pripalo 149 (51,2%) jedinki i toplokrvnu, koju su sačinjavale 142 (48,8%) životinje. Prema dobi, populaciju je činilo 102 (35,05%) konja mlađa od pet godina, a 189 (64,95%) konja bilo je u dobi od pet godina ili više.

Konji serološki pozitivni na bakteriju *S. equi* detektirani su u svim županijama uključenim u istraživanje. Od ukupno 291 uzorka, 48 (16,5%) ih je bilo pozitivno. Utvrđena seroprevalencija po županijama kretala se od 7,1% do 12,1%, s iznimkom Sisačko-moslavačke županije gdje je utvrđena seroprevalencija od 29,6%. Postotak pozitivnih u ostalim županijama vidljiv je u Tablici 3. Od 48 pozitivnih, 27 (56,3%) je bilo pozitivno na antigen A, 16 (33,3%) na antigen C, a pet (10,4%) je bilo pozitivno na oba antigena. Nije uočena statistički značajna razlika u seropozitivnosti

obzirom na spol životinja ($p>0,05$). Veća seropozitivnost utvrđena je u konja starijih od pet godina ($p<0,01$). Također je veća seropozitivnost utvrđena u konja hladnokrvnih pasmina ($p<0,05$). Zabilježen je pozitivan međuodnos između broja konja u županijama i seroprevalencije (Graf 1.).

ŽUPANIJA	BROJ UZORAKA/BROJ GOSPODARSTAVA	POZITIVNI
1. Sisačko-moslavačka	98/29	29 (29,6%)
2. Zagrebačka i Grad Zagreb	55/27	6 (10,9%)
3. Osječko-baranjska	33/15	4 (12,1%)
4. Primorsko-goranska	30/10	3 (10,0%)
5. Brodsko-posavska	26/16	2 (7,7%)
6. Bjelovarsko-bilogorska	22/13	2 (9,1%)
7. Koprivničko-križevačka	14/9	1 (7,1%)
8. Krapinsko-zagorska	13/8	1 (7,7%)
UKUPNO	291/127	48 (16,5%)

Tablica 3. Seroprevalencija po županijama



Graf 1. Odnos broja konja i seroprevalencije po županijama



Slika 5. Prevalencija po županijama

1. Sisačko-moslavačka (29,6%)
2. Zagrebačka i Grad Zagreb (10,9%)
3. Osječko-baranjska (12,1%)
4. Primorsko-goranska (10,0%)
5. Brodsko-posavska (7,7%)
6. Bjelovarsko-bilogorska (9,1%)
7. Koprivničko-križevačka (7,1%)
8. Krapinsko-zagorska (7,7%)

6 Rasprava

Ovim istraživanjem utvrđena seroprevalencija iznosila je 16,5%. Istraživanja seroprevalencije ždrebećaka su malobrojna, a podatke je teško uspoređivati zbog uporabe različitih ELISA različite specifičnosti. U Iranu je zabilježena seroprevalencija od 37,5% (MOHAMMADI i sur., 2016.), no ELISA koja je rabljena nije visoko specifična za *S. equi* zbog čega je moguće da je tako velika seroprevalencija posljedica i unakrižnih reakcija s protutijelima na *S. zooepidemicus*. IJAZ i sur., 2012. istraživali su incidenciju *S. equi* izdvajanjem bakterije, no iz konja u kojih je klinički postavljena sumnja na ždrebećak. To objašnjava visok udio konja (45,2%) iz kojih je izdvojen uzročnik. U ovom istraživanju najveća seroprevalencija utvrđena je u Sisačko-moslavačkoj županiji, u kojoj obitava četvrtina ukupne populacije konja u Republici Hrvatskoj (GODIŠNJE IZVJEŠĆE O UZGOJU KOPITARA, 2018.). Većina konja u Sisačko-moslavačkoj županiji hladnokrvnih su pasmina (GODIŠNJE IZVJEŠĆE O UZGOJU KOPITARA, 2018.) i u toplijem dijelu godine držani su skupno na pašnjacima. Ovakav način držanja pogoduje međusobnom kontaktu velikog broja životinja što pak pospješuje širenje uzročnika. Kada bismo izuzeli Sisačko-moslavačku županiju, prosječna seroprevalencija u ostalim županijama iznosila bi 9,2%, podjednako seroprevalencijama utvrđenim u Izraelu (9,5%) i Lesotu (10,2%) (TIROSH-LEVY i sur., 2016.; LING i sur., 2011.). U istraživanjima koja su proveli TIROSH-LEVY i sur. (2016.) i LING i sur. (2011.), za pretraživanje seruma rabljena je ista iELISA kao u ovom istraživanju. Ova iELISA ima visoku specifičnost jer za detekciju protutijela koristi dijelove proteina specifične za *S. equi*, za razliku od drugih komercijalno dostupnih ELISA koje za detekciju protutijela rabe protein SeM, zajednički bakterijama *S. equi* i *S. zooepidemicus*. Zbog toga je njihovom uporabom moguće dobiti lažno pozitivan rezultat kao posljedicu unakrižne reaktivnosti sa bakterijom *S. zooepidemicus* koja se može nalaziti i kao komenzal na različitim sluznicama konja, a može biti i uzročnik infekcija različitih organskih sustava. Uporaba ELISA-e koja se temelji na detekciji protutijela na protein SeM tako može polučiti lažno pozitivne rezultate odnosno utvrditi veću seroprevalenciju nego što ona zaista jest. Indirektni imunoenzimni test rabljen u ovom istraživanju za detekciju protutijela rabi dva antigena specifična za

S.equi (antigen A i antigen C). Konji se smatraju pozitivnima neovisno o tome na koji je antigen dobiven pozitivan rezultat. U Hrvatskoj i Izraelu utvrđena je seropozitivnost na oba antigena (antigen A i C), a u Lesotu isključivo na antigen A.

Prema očekivanju, nije ustanovljena značajna razlika u seropozitivnosti obzirom na dob konja. Veća seropozitivnost utvrđena je u konja starijih od pet godina ($p < 0,01$) što je logično i lako objašnjivo činjenicom da su odrasli ili stariji konji imali veću mogućnost doći u kontakt s uzročnikom. Znajući da konji mogu ostati seropozitivni mjesecima i godinama nakon primarne infekcije, veća seropozitivnost može se očekivati u starijih dobnih skupina. Veća seropozitivnost u hladnokrvnih konja utvrđena u ovom istraživanju vjerojatno je posljedica velike seroprevalencije u Sisačko-moslavačkoj županiji, u kojoj većinu populacije čine hladnokrvnjaci, a ne stvarne pasminske predispozicije.

Uočena je pozitivna korelacija između broja konja u pojedinoj županiji i seroprevalenciji; što je veća populacija konja veća je i seroprevalencija, vjerojatno zbog toga što o veličini populacije ovisi i gustoća populacije, a samim time i intenzitet kontakata između životinja.

7 Zaključci

- 1) Infekcija bakterijom *Streptococcus equi* subsp. *equi* prisutna je u populaciji konja u svih osam pretraživanih županija u kojima se i nalazi većina konja u Republici Hrvatskoj.
- 2) Najveća seroprevalencija zabilježena je u Sisačko-moslavačkoj županiji u kojoj živi četvrtina ukupnog broja konja u RH. Populaciju konja u Sisačko-moslavačkoj županiji većinom čine hladnokrvni, u toplijem dijelu godine slobodno držani konji, što pogoduje širenju bolesti.
- 3) Veća seroprevalencija u hladnokrvnih konja utvrđena u ovom istraživanju vjerojatno je posljedica velike seropozitivnosti u Sisačko-moslavačkoj županiji, a ne stvarne pasminske predispozicije.
- 4) Ždrebećak je široko rasprostranjena bolest u Republici Hrvatskoj. Budući da u RH ne podliježe obaveznom prijavljivanju, osvješčivanje vlasnika i veterinaru te objektivno dijagnosticiranje bolesti, praćenje kliničkih oblika i analiza sojeva bakterija prisutnih u Hrvatskoj nužan su preduvjet kontroli i sprječavanju širenja bolesti.

8 Popis literature:

1. ALBINI, S., KORCZAK, B.M., ABRIL, C., i sur. (2008): Mandibular lymphadenopathy caused by *Actinomyces denticoles* mimicking strangles in three horses, *Vet Rec*; 162:158-159.
2. ANIMAL HEALTH TRUST, SURVEILLANCE OF EQUINE STRANGLES : <https://www.aht.org.uk/disease-surveillance/surveillance-equine-strangles>
3. BERLIN, D., KELMER, G., STEINMANN, A., SUTTON, G.A. (2013): Successful medical management of intra-abdominal abscesses in 4 adult horses, *Can Vet J*; 54:157–161.
4. BOYLE, A.G., TIMONEY, J.F., J.R. NEWTON, M.T. HINES, A.S. WALLER, B.R. BUCHANAN (2018): *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles – Revised Consensus Statement, *J Vet Intern Med*;32:633-647.
5. BOYLE, A.G., BOSTON, R.C., O’SHEA, K., i sur.(2012): Optimization of an in vitro assay to detect *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Vet Microbiol*;159:406–410.
6. BOYLE, A.G., RANKIN, S.C., DUFFEE, L., i sur.(2016): *Streptococcus equi* detection PCR assay for equine nasopharyngeal and guttural pouch wash samples, *J Vet Intern Med*;30:276–281.
7. CHANTER, N., NEWTON, J.R., WOOD, J.L.N., i sur.(1998): Detection of strangles carriers, *Vet Rec*;142:496.
8. CVETNIĆ,S. (2008) : Bakterijske i gljivične bolesti životinja, Medicinska naklada, Zagreb
9. DUJARDIN, C.L.(2011): Multiple small-intestine intussusceptions: A complication of *purpura hemorrhagica* in a horse, *Tijdschr Diergeneeskd*;136:422–426.
10. DURWARD-AKHURST, S.A., VALBERG, S.J.(2017): Immune-mediated muscle diseases of the horse, *Vet Pathol*;55:68–75.
11. GODIŠNJE IZVJEŠĆE O UZGOJU KOPITARA 2018: <https://hpa.mps.hr/wp-content/uploads/2019/05/gi-2018-konjogojstvo.pdf>
12. EUROPSKA AGENCIJA ZA LIJEKOVE 2014: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/equilis-strepe-epar-product-information_hr.pdf

13. HOFFMAN, A.M., STAEMPFLI, H.R., PRESCOTT, J.F., VIEL, L.(1991): Field evaluation of a commercial M protein vaccine against *Streptococcus equi* infection in foals, *Am J Vet Res*;52:589–595.
14. IJAZ, M., KHAN, M.S., DOURANI, A.Z., SALEEM, M.H., i sur. (2012): Prevalence and haemato-biochemical studies of strangles (*Streptococcus equi*) affected horses in Pakistan, *J Anim Plant Sci*;22:295-299.
15. JORM, L.R., PLOWRIGHT,W.,P.D. ROSSDALE,J.F. WADE (1992):Laboratory studies on the survival of *Streptococcus equi* subspecies *equi* on surfaces,Proceedings of Equine Infectious Diseases VI. Newmarket, UK: R & W Publications Ltd, 39–43.
16. KAESE, H.J., VALBERG, S.J., HAYDEN, D.W., i sur.(2005): Infarctive purpura hemorrhagica in five horses, *J Am Vet Med Assoc*;226:1893–1898.
17. LADLOW, J., SCASE,T.,WALLER,A. (2006): Canine Strangles Case Reveals a new host Susceptible to Infection with *Streptococcus equi*,*J Clin Microbiol*;44:2664-2665.
18. LINDAHL, S., BAVERUD, V., EGENVALL, A., i sur.(2013): Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *equi* in horses from confirmed strangles outbreaks, *J Vet Intern Med*;27: 542–547.
19. LING, A.S.G., UPJOHN, M.M., WEBB,K., WALLER,A.S., VERHEYEN, K.L.P. (2011): Seroprevalence of *Streptococcus equi* in working horses in Lesotho, *Vet Rec*;169:72.
20. MOHAMMADI, A., POURMAHDI BORUJENI,M., GHARIBI,D., MASHHADI, A. (2016): A serological survey on strangles disease in horses of some areas in Khuzestan province by ELISA, *J Vet Res*;71:373-379.
21. MUKHTAR, M.M., TIMONEY, J.F. (1988): Chemotactic response of equine polymorphonuclear leucocytes to *Streptococcus equi*, *Res Vet Sci*; 45:225–229.
22. NAGLIĆ,T., HAJSIG,D.,MADIĆ,J.,PINTER,LJ. (2005) : Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija, Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 201-202
23. NEWTON, J.R., WOOD, J.L.N., DUNN, K.A., i sur.(1997): Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*, *Vet Rec*;140:84–90.
24. NEWTON, J.R., WOOD, J.L.N., CHANTER, N. (1997): Strangles: Long term carriage of *Streptococcus equi* in horses, *Equine Vet Educ*;9:98–102.

25. NEWTON, J.R., VERHEYEN, K., TALBOT, N.C., i sur.(2000): Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*, Equine Vet J;32:515–526.
26. PICHE, C.A.(1984): Clinical observations on an outbreak of strangles, Can Vet J;25:7–11.
27. PUSTERLA, N., KASS, P.H., MAPES, S.,C.JOHNSON, BARNETT D.C., VAALA W.,GUTIERREZ C.,McDANIEL R., WHITEHEAD B., MANNING J. (2011): Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA, Vet Rec;169:12.
28. PUSTERLA, N., WHITCOMB, M.B., WILSON, W.D.(2007): Internal abdominal abscesses caused by *Streptococcus equi* subspecies *equi* in 10 horses in California between 1989 and 2004, Vet Rec;160:589–592.
29. ROBINSON, C., STEWARD, K.F., POTTS, N., i sur.(2013): Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure, Vet J;197:188–191.
30. SCHÜTZ, J.W. (1988): The streptococcus of strangles. Journal of Comparative Pathology; 1: 191-208.
31. SWEENEY, C.R.,P.J. TIMONEY,R.J. NEWTON, M.T. HINES (2007): Streptococcal infections. In: Equine infectious diseases, (Sellon, D.C., M.T. Long) Saunders, Elsevier Inc., St. Louis. str. 244-256.
32. SHEORAN, A.S., SPONSELLER, B.T., HOLMES, M.A., i sur.(1997): Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses, Vet Immunol Immunopat;59:239–251.
33. SPONSELLER, B.T., VALBERG, S.J., TENNENT-BROWN, B., FOREMAN, J.H., KUMAR, P., TIMONEY, J.F.(2005): Severe acute rhabdomyolysis in 4 horses associated with *Streptococcus equi* subspecies *equi* infection, J Am Vet Med Assoc;227:1800–1807.
34. SWEDISH NATIONAL VETERINARY INSTITUTE :
<https://www.sva.se/en/animal-health/horses>
35. SWEENEY, C.R., TIMONEY, J.F., NEWTON, J.R., M.T. HINES (2005): *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles, J Vet Intern Med;19:123-134.
36. TIMONEY, J.F., ARTIUSHIN, S.C.(1997): Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification, Vet Rec;141:446–447.

37. TIMONEY, J.F., KUMAR, P. (2008): Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles), *Equine Vet J*; 40:637–642.
38. TIMONEY, J.F., SUTHER, P., VELINENI, S., ARTIUSHIN, C. (2014): The antiphagocytic activity of SeM of *Streptococcus equi* requires capsule, *J Equine Sci*; 25:53–56.
39. TIROSH-LEVY, S., BLUM, S.E., STEWARD, K.F., WALLER, A.S., STEINMAN, A. (2016): *Streptococcus equi* subspecies *equi* in horses in Israel: seroprevalence and strain types, *Vet Rec Open*;3.
40. VALBERG, S.J., BULLOCK, P., HOGETVEDT, W., i sur. (1996): Myopathies associated with *Streptococcus equi* infections in horses, *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*; 42:292–293.
41. VAN DER KOLK, J.H., KROEZE VELDHUIS, E.J.B. (2013): Infectious diseases of the horse, Diagnosis, pathology, management, and public health, Manson Publishing Ltd, str. 78-85.
42. VERHEYEN, K., NEWTON, J.R., TALBOT, N.C., i sur. (2000): Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*, *Equine Vet J*; 32:527–532.
43. WALLER, A.S. (2014): New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses, *Vet Clin N Am-Equine*; 30:591–607.
44. WEESE, J.S., JARLOT, C., MORLEY, P.S. (2009): Survival of *Streptococcus equi* on surfaces in an outdoor environment, *Can Vet J*; 50:968–970.

9 Sažetak

Ždrebećak je najvažnija i geografski najrasprostranjenija bakterijska bolest ekvida u svijetu uzrokovana bakterijom *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Bolest je akutnog tijeka te se očituje vrućicom, upalom gornjih dišnih puteva i regionalnih limfnih čvorova. Prenosi se direktnim i indirektnim kontaktom, a posebnu prijetnju predstavljaju subklinički kliconoše. Javlja se ponajprije u ždrebadi, ali mogu oboljeti i odrasli konji. Dijagnostika se vrši bakteriološkim, serološkim i molekularnim metodama. Liječenje ovisi o stadiju bolesti u kojem se životinja nalazi, a uključuje potpurnu terapiju i antibiotike ukoliko postoje indikacije za njihovu primjenu. Za kontrolu i prevenciju bolesti ključno je postavljanje adekvatnih biosigurnosnih mjera kao i neizostavna edukacija vlasnika o bolesti. S obzirom da u Hrvatskoj ne postoje podaci o seroprevalenciji ždrebećaka, ovo istraživanje provedeno je u svrhu dobivanja jasnije slike o rasprostranjenosti bolesti u državi. Pretražen je 291 serum konja iz osam županija metodom indirektno ELISA-e. Rezultati su pokazali da je od 291 seruma 48 pozitivno (16,5%). Seroprevalencija po županijama varira od 7,1% do 12,6% s iznimkom Sisačko-moslavačke županije u kojoj je 29,6% testiranih konja pozitivno budući da na tim prostorima boravi četvrtina ukupne populacije konja u Hrvatskoj te su oni većim dijelom godine u međusobnom kontaktu. Vidljivo je da je bolest rasprostranjena i upravo zato potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo u kojim oblicima se javlja te koji sojevi cirkuliraju na našem području.

10 Summary

Seroprevalence of Strangles in the Republic of Croatia

Strangles is the most important and geographically most widespread bacterial disease of equines in the world, which is caused by the bacterium *Streptococcus equi* subsp. *equi*. It is an acute disease manifested by fever, upper respiratory tract inflammation and inflammation of regional lymph nodes. It is transmitted by direct or indirect contact, but a particular threat is posed by subclinical carriers. The most affected group are foals, but adult horses can be infected too. Diagnostic methods include bacteriological, serological and molecular methods. Treatment depends on the stage of the disease and includes supportive therapy and antibiotics if there are indications for their use. The key of control and prevention is implementation of adequate biosecurity measures and indispensable education of horse owners. Since there is no data about seroprevalence of strangles in Croatia, this study was conducted in order to get a clearer picture on strangles in the country. Two hundred ninety one (291) horse sera from eight counties were tested by an indirect ELISA. Results showed that 48 out of 291 were positive (16,5%). Seroprevalence in counties varies from 7,1% to 12,6% with one exception of Sisačko-moslavačka county in which there were 29,6% positive horses. This is explained by the fact that one quarter of Croatian horses live there and most of the year they are in contact with each other. It is evident that the disease is widespread. In order to determine circulating strains and clinical forms of the disease further studies need to be conducted.

11 Popis korištenih kratica

PCR (*eng. Polymerase Chain Reaction*) : lančana reakcija polimerazom

qPCR (*eng. Real-time Polymerase Chain reaction*) : lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

SeM : *Streptococcus equi* M protein

ELISA (*eng. Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) : imunoenzimni test

iELISA (*eng. indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay*): indirektni imunoenzimni test

12 Popis priloga

Slike:

1. *Streptococcus equi* subsp. *equi* na krvnom agaru
(<http://www.bacteriainphotos.com/streptococcus%20equi.html>)
2. Purulentni iscjedak iz nosa
(<https://thehorse.com/159833/the-latest-on-strangles-in-horses/>)
3. Rupturirani limfni čvorovi konja
(<http://www.horsevet.co.uk/strangles.htm>)
4. Oguljena koža kao posljedica purpura
(<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/purpura-haemorrhagica>)
5. Prevalencija po županijama

Tablice:

1. Usporedba načina uzorkovanja (Boyle i sur., 2018.)
2. Interpretacija SeM specifičnog testa (ELISA) (Sellon i Long, 2007.)
3. Seroprevalencija ždrebećaka po županijama

Grafovi:

1. Odnos broja konja i seroprevalencije po županijama

13 Životopis

Tea Lukanec rođena je 18. veljače 1995. godine u Koprivnici. Osnovnu školu pohađala je u Virju, nakon čega upisuje Opću gimnaziju u Đurđevcu. Po završetku gimnazije 2013. godine, upisuje Veterinarski fakultet u Zagrebu. Dvije godine aktivno sudjeluje u studentskoj udruzi "IVSA" te je kroz posljednje dvije godine studija volontirala na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta.