



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Juraj Šavorić

UTJECAJ HERPESVIRUSNIH INFEKCIJA U KOZA NA USPJEŠNOST REPRODUKCIJE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Juraj Šavorić

INFLUENCE OF HERPESVIRUS INFECTION ON REPRODUCTION IN GOATS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Juraj Šavorić

UTJECAJ HERPESVIRUSNIH INFEKCIJA U KOZA NA USPJEŠNOST REPRODUKCIJE

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Branimira Špoljarić
izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović

Zagreb, 2024



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Juraj Šavorić

INFLUENCE OF HERPESVIRUS INFECTION ON REPRODUCTION IN GOATS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Branimira Špoljarić PhD, associate professor
Vladimir Stevanović PhD, associate professor

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Juraj Šavorić (*ime i prezime studenta*), potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2024 godina

ZAHVALA

Zahvaljujem se mojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Branimiri Špoljarić i izv. prof. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću, na usmjeravanju, savjetima, pomoći i ažurnosti. Da opet moram birati, ne bih Vas mijenjao ni za što.

Zahvaljujem se svim kolegama Klinike za porodništvo i reprodukciju, na čelu s predstojnikom prof. dr. sc. Tugomirom Karadjoletom, na sufinanciranju, razumijevanju i svim toplim riječima u trenucima kada su bile potrebne. Radi Vas odlazim na posao sa smiješkom.

Zahvaljujem se trenutnoj Upravi fakulteta na brojnim izlascima ususret, čime su sveli moju tjeskobu na minimum.

Zahvaljujem se djelatnicima Virološkog laboratorija na savjetima i kolegijalnosti.

Hvala vlasnicima farmi što su mi dopustili prikupljanje uzoraka i što su mi pružili uvid u tražene podatke, neophodne za izradu doktorskog rada.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Silviju Vinceu, na statističkoj obradi podataka.

Naposljetku, neizmjereno se zahvaljujem mojoj supruzi Ani. Pružila mi je bezuvjetnu ljubav i neopisivu podršku, bez kojih sigurno ne bih uspio izgurati doktorski rad do kraja. Samo ti.

Hvala mojoj djeci, sinu Maku i kćeri Leni, jer su svojom iskrenom dječjom topline i osmjesima uspjeli učiniti da u sekundi zaboravim na stres koji me pratio prilikom izrade rada.

Mojim roditeljima, Darku, Ivi i Tomeku zahvaljujem se na podršci, savjetima i vremenu koje su proveli slušajući moje probleme, isto vrijedi i za moje sestre (5!), te ostalu obitelj.

Sretan sam što Vas imam!

SAŽETAK

Do sada je opisano četiri vrste herpesvirusa u koza: kozji herpesvirus 1 kozji herpesvirus, kozji limfotropni herpesvirus, te mogu biti rezervoari za ovčji herpesvirus 2. Smatra se da je kopulacija značajan način širenja, a dokazano je da infekcija može uzrokovati pobačaj, rađanje avitalne jaradi, vulvovaginits, balanopostitis i respiratorne probleme. Do danas u Republici Hrvatskoj nije provedeno sustavno istraživanje seroprevalencije i epizootiologije kozjih herpesvirusa niti su rađene poveznice s reproduktivnim poremetnjama u koza.

Hipoteza istraživanja bila je da infekcije herpesvirusima utječu na zdravlje i reprodukciju koza, a cilj je bio odrediti proširenost herpesvirusnih infekcija koza, pokušati razjasniti epizootiologiju bolesti i utjecaj na kozarsku proizvodnju. Uzorkovanje je provedeno na 248 jedinki vrste koze na četiri različite farme i od 77 jaradi, tijekom dva stresna razdoblja u proizvodnji – tijekom sezone pripusta i ranog graviditeta, te u ranom puerperiju.

Svakoj jedinki uzeta je krv za serološku i hematološku pretragu, uzeti su brisevi sluznica nosa i stidnice ili prepucija za molekularnu dijagnostiku, te je učinjen klinički pregled pri kojem su prikupljeni podaci o: pasmini, dobi, spolu, kondiciji, tjelesnoj temperaturi, prisutnosti iscjetka i drugim zdravstvenim problemima. Za analizu utjecaja infekcije na jarad mjerena je tjelesna masa pri porodu, opseg glave, opseg prsa, dužina tijela i pojedine fetometrijske mjere u gravidnih koza. Također, prikupljeni su podaci o preganjanju, pobačajima i ostalim reproduktivnim parametrima. Za utvrđivanje izlučivanja virusa koristila se molekularna metoda lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction - PCR), a za izloženost infekciji imunoenzimni test. Dobiveni odsječci nukleinskih kiselina poslani su na utvrđivanje slijeda nukleotida, kako bi se utvrdilo o kojoj vrsti herpesvirusa se radi.

PCR pozitivnih bilo je 148 jedinki, od kojih 88 na infekciju kozjim herpesvirusom 2, a 53 na limfotropni kozji herpesvirus, dok za ostale nije utvrđena vrsta virusa. Devet jedinki bilo je serološki pozitivno na kozji herpesvirus 1. Udio pozitivnih rezultata PCR pretrage skupnih uzoraka se statistički značajno razlikovao između promatranih farmi ($P=0,0445$), pojavnost dokazanih herpesvirusa se statistički značajno razlikovala na istraživanim

farmama ($p=0,0023$), kao i među pasminama ($p=0,0071$). Statistički značajna bila je razlika ($p<0,0082$) u broju limfocita između negativnih (40,4) i pozitivnih (30,75) uzoraka, kao i razlika između pojedinih vrsta kozjih herpesvirusa (CpHV-1 34,37, CpLHV 27,34; $p<0,01$). Među tjelesnim mjerama jaradi tendenciju prema statistički značajnoj razlici ($p=0,08$) zabilježena je u opsegu glave. Porođajna masa jaradi statistički se značajno razlikovala između CpHV-2 i negativnih odnosno koza inficiranih s CpLHV, kao i broj porođene jaradi. Statistički je značajno da je tjelesna masa jaradi po odbiću bila veća u pozitivnih jedinki ($p=0,005$). Postoji statistička značajnost između količine proizvedenog kolostruma između pozitivnih i negativnih jedinki. Značajan utjecaj na reprodukciju nije uočen, osim da koze s negativnom PCR pretragom obrisaka nosa i stidnice daju više jaradi u odnosu na koze inficirane s CpHV-2 i CpHLV, te smanjene mliječnosti u pozitivnih koza. Također, po prvi puta izoliran je uzročnik kozjeg herpesvirusa iz mlijeka, što daje jasniju sliku na puteve širenja.

Ključne riječi: kozji herpesvirus, reproduktivna uspješnost, epizootiologija, molekularna i serološka dijagnostika, Hrvatska

EXTENDED ABSTRACT

Influence of herpesvirus infection on reproduction in goats

INTRODUCTION

There are four known species of herpesviruses in goats. There is no evidence of the clinical manifestation of the infection. Thus infection is considered to be inapparent. It has been proven that some herpesviruses can cause malignant catarrhal fever (MCF) in susceptible ruminants and can have a negative effect on reproduction. Together with the clinical examination results, mucosal swabs, blood and milk samples and epizootiological data were collected to determine the prevalence, clinical manifestation and infection risk factors on individual and farm levels. Reproductive parameters were compared between infected and non-infected goats. The infection's influence on the growth and development of the kids was determined by comparing the body measures of the offspring after kidding. Obtained results could provide us with better insight into epizootiology and pathogenesis of herpesvirus infections in goats.

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted on four farms in Croatia that had different goat breeds. Two farms consisted of the Alpine breed and two of the Saanen breed. Sample collection began in February 2022 and ended in May 2023. Farms were selected based on the availability of animals for sampling and the absence of systematic immunoprophylaxis for goat herpesvirus infection. The study included goats and bucks of various ages, and sampling was conducted during two stressful periods in goat farming – during pregnancy at two intervals: 30-40 days or 60-80 days post-breeding and during the early puerperium, i.e., within a month after giving birth. Before sampling, an epizootiological form was completed together with the owners, which included data on the age and sex of the individual, parity, management practices, and any health problems, as well as information on the number of kids born stillborn, weaning, birth weight, and physical measurements of the kids. Additional epizootiological data were collected during anamnesis, as well as data on past fertility parameters and possible pregnancy pathologies. For the research, samples were taken from the nasal and vaginal mucosa in females and prepuce in males;

blood was drawn from the jugular vein into two tubes, and a milk sample was taken along with an examination of the udder. A general clinical examination of each individual was also performed. During the breeding season, 30 to 40 days post-breeding, pregnancy diagnostics were performed using transabdominal ultrasound examination, and on some farms, fetometry was performed during the first and second trimesters of pregnancy. Due to the initial assumption of a lower prevalence of the disease, pooled samples of vaginal or preputial swabs and nasal mucosa were first created. The prepared samples were thawed at room temperature and mixed using a vortex mixer. After mixing, 100 μ L of phosphate buffer with the nasal mucosa swab sample and 100 μ L of phosphate buffer with the nasal swab sample from the same individual were taken using a pipette, and viral DNA was extracted according to the protocol below. If the test showed a positive reaction, the samples were re-isolated, but separately for the nasal mucosa and separately for the vaginal or preputial mucosa to determine the route of virus shedding. In addition to these samples, milk samples from goats during lactation and immediately after birth (colostrum) were prepared for PCR testing.

For the extraction of total DNA from the samples, the commercial IndiSpin Pathogen Mini Kit (INDICAL BIOSCIENCE, Leipzig, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Panherpes PCR (VanDevanter et al., 1996) is a nested PCR method used to amplify a portion of the herpesvirus DNA polymerase gene of approximately 800 base pairs. For performing the PCR reaction, a BioRad MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad, Richmond, USA) was used.

After completion of the PCR cycles, PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis. The gel was stained with an appropriate DNA stain (e.g., ethidium bromide) and visualised under UV light.

The nucleotide sequence of the amplified segment of viral DNA was determined for the purpose of molecular typing and phylogenetic analysis of small ruminant herpesviruses in Croatia. Macrogen, Amsterdam, Netherlands, determined the nucleotide sequence using the ABI PRISM BigDye Terminator Kit (Applied Biosystem, Carlsbad, California, USA) on the 3730 x 1 DNA analyzer from the same manufacturer. The same primers as in the described PCR method were used.

Further analysis of DNA sequences was performed using the MEGA 11 software (Kumar et al., 2016). This software facilitated multiple alignments of DNA sequences and identification of polymorphic sites within each sample sequence. Using the maximum likelihood (ML) method, nucleotide sequences of the amplified viral DNA segments were compared with available sequences from the NCBI gene bank for specific types of small ruminant herpesviruses and cattle.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to diagnose CpHV-1 in the Virology Laboratory of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with the Clinic, Veterinary Faculty of the University of Zagreb. Blood samples from goats were tested using the Eradikit TM CpHV1 (IN3 Diagnostics, Torino, Italy) indirect ELISA for serological diagnosis of goat herpesvirus 1 infection.

RESULTS

In this study, sampling was conducted on 248 individual goats across four different farms. There were 242 goats and 6 bucks. On farm labelled 1, 155 goats were sampled; on farm labelled 2, there were 44 goats; on farm labelled 3, there were 13 goats; and on farm number 4, a total of 36 goats. There were 199 Alpine breed goats (farms 1 and 2), and 49 Saanen breed goats (farms 3 and 4). Each farm followed a very similar reproductive management, considering the seasonality of the sexual cycle. On farms 2 and 3, the goats were kept in two random herds, separated by a solid wall, while on farms 1 and 4 they were divided by age categories, separated by a grid fence. Deworming methods were the same on all four farms. Clinical examination findings were available for all individuals in the study and a complete blood count for 233 individuals. Using the PCR method, a total of 233 pooled samples of nasal and vulvar or preputial mucosa swabs were examined. From the obtained positive samples, sequence analysis was performed on 141 of them, and such pooled samples were isolated separately again, to determine the pathways of virus excretion. In addition, 184 samples of goat milk were examined with PCR. Serological diagnostics for exposure to CpHV-1 were conducted on 233 goat blood sera, and for exposure to Arthritis-encephalitis virus on 210 samples. Body measurements were taken on 77 kids, and foetometric measurements on 20 fetuses

The prevalence of goat herpesviruses (CpHV-2 and CpLHV) on the investigated farms was 62.29%. Out of 227 animals, CpHV-2 was detected in 38.76% of them, while CpLHV was present in 23.34%. A swab of the vulvar or preputial mucosa was positive in 61% of cases of CpHV-2 infection, and a nasal mucosa swab was positive in 79% of infected goats. In contrast, for samples where CpLHV was detected, the vulvar or preputial mucosa swab was positive in 83.61% of cases, and the nasal swab was positive in 60.66% of the tested samples. The proportion of positive PCR test results for pooled samples differed statistically significantly between the observed farms ($P=0.0445$), and the occurrence of confirmed herpesviruses also differed statistically significantly on the investigated farms ($p=0.0023$) as well as among breeds ($p=0.0071$). A statistically significant difference ($p<0.0082$) was observed in the number of lymphocytes between negative (40.4) and positive (30.75) samples, as well as between different types of goat herpesviruses (CpHV-1 34.37, CpLHV 27.34; $p<0.01$). Among the physical measurements of kids, a tendency towards a statistically significant difference ($p=0.08$) was recorded in head circumference. The birth weight of kids differed statistically significantly between CpHV-2 and negative or CpLHV-infected goats, as did the number of offspring. Statistically significant was the observation that the body weight of kids at weaning was higher in positive individuals ($p=0.005$). There was a statistically significant difference in the amount of colostrum produced between positive and negative individuals. No significant impact on reproduction was observed, except that goats with negative PCR tests of nasal and vulvar swabs produced more kids compared to goats infected with CpHV-2 and CpLHV, and there was reduced milk yield in positive goats. Additionally, for the first time, a goat herpesvirus was isolated from milk, providing a clearer understanding of transmission pathways.

CONCLUSIONS

1. Goat herpesviruses are present in the territory of the Republic of Croatia, with confirmed species being CpHV-2 and CpHLV, and evidence of exposure to the CpHV-1 virus.
2. Farm management and animal husbandry significantly affect the prevalence of the virus as well as differences in clinical findings.
3. Infected individuals exhibit pronounced lymphopenia, especially with CpLHV infection, although within the reference hematological values for goats.
4. Despite the high prevalence, the percentage of pregnant individuals did not differ from usual values.
5. Goats whose nasal and vulvar mucosal swab samples tested negative by PCR had a higher number of offspring compared to positive goats, with a notable difference concerning the infection.
6. Despite the high prevalence, the percentage of pregnant individuals did not differ from usual values.
7. Goats infected with CpHLV give birth to kids with smaller head circumferences, while infection with CpHV-2 results in fewer kids with higher birth weights.
8. CpHV-2 and CpHLV can be excreted in milk and cause a drop in milk production, especially during infection with CpHV-2 and during the first month of lactation.

Key words: Goat herpesviruses, Reproductive parameters, epizootiology, molecular and serological diagnostics

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA.....	4
2.1. FIZIOLOGIJA RASPLOĐIVANJA KOZA.....	4
2.1.1. Spolni ciklus koza	4
2.1.2. Folikularna dinamika.....	6
2.1.3. Sezonálnost mužjaka	7
2.1.4. Nastup puberteta.....	8
2.2. DRŽANJE KOZA.....	8
2.3. TEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA KOZA	9
2.3.1. Prirodni pripust.....	9
2.3.2. Umjetno osjemenjivanje.....	10
2.3.3. Reproduktivni menadžment	10
2.4. GRAVIDITET	12
2.4.1. Dijagnostika graviditeta	13
2.4.2. Intrauterini rast jaradi i fetometrija	14
2.5. POSTPOROĐAJNO RAZDOBLJE	16
2.5.1. Broj ožarene jaradi.....	16
2.5.2. Laktacija u koza	17
2.5.3. Odbiće i preživljavanje jaradi	19
2.6. POKAZATELJI REPRODUKTIVNE USPJEŠNOSTI	20
2.6.1. Dob i veličina majke	20
2.6.2. Embrionalna i fetalna smrtnost	21
2.6.3. Pobačaji	21
2.6.4. Porodajna masa, perinatalna uginuća i broj odbijene jaradi.....	22
2.7. KOZJI HERPESVIRUSI	24
2.7.1. Povijest.....	24
2.7.2. Građa herpesvirusa.....	27
2.7.3. Genom herpesvirusa.....	27
2.7.4. Taksonomija i klasifikacija	28
2.7.5. Tenacitet.....	30

2.7.6. Proširenost.....	30
2.7.7. Epizootiologija	31
2.7.8. Patogeneza.....	33
2.7.9. Klinička slika.....	34
2.7.10. Patoanatomski i patohistološki nalaz	36
2.7.11. Dijagnostika	37
2.7.12. Liječenje	38
2.7.13. Imunoprofilaksa	38
2.7.14. Javno zdravstvo	39
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	40
4. MATERIJALI I METODE.....	42
4.1. PLAN ISTRAŽIVANJA I PLAN UZORKOVANJA	42
4.1.1. Na razini farme koza	43
4.1.2. Na razini jedinke	46
4.1.3. Klinički pregled.....	47
4.1.4. Krv.....	47
4.1.5. Mlijeko	48
4.1.6. Obrisci sluznica	48
4.1.7. Ultrazvuk i fetometrija	49
4.1.8. Tjelesna masa i mjere jaradi	49
4.2. IZOLACIJA DNK	51
4.2.1. Priprema uzoraka.....	51
4.2.2. Izdvajanje virusne DNK.....	51
4.2.3. Postupak izolacije DNK korištenjem IndiSpin Pathogen kompleta.....	52
4.3. PCR – lančana reakcija polimerazom	53
4.3.1. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom prema metodi ugniježdene PCR	53
4.3.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu.....	57
4.3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a.....	60
4.3.4. Postupak pročišćavanja PCR produkata.....	60
4.4. SEROLOGIJA	61
4.4.1. Imunoenzimni test za dokaz izloženosti CpHV-1.....	61

4.4.2. Imunoenzimni test za dokaz izloženosti artritisa encefalitis virusu.....	64
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	68
5. REZULTATI	69
5.1. Prikupljeni podaci i rezultati	69
5.2. Hematološki parametri u koza i rezultati analize.....	73
5.3. Rezultati kliničkog pregleda koza i rezultati analize	79
5.3.1. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije	80
5.3.2. Promjene na sluznicama.....	81
5.3.3. Promjene na limfnim čvorovima.....	87
5.3.4. Prisutnost apscesa.....	88
5.3.5. Promjene na mliječnoj žlijezdi	90
5.3.6. Prisutnost iscjetka.....	92
5.3.7. Dobna predispozicija i pojava uginuća	94
5.4. Pokazatelji reproduktivne učinkovitosti	95
5.4.1. Poganjanje	95
5.4.2. Pobačaj	96
5.4.3. Mrtvorođenje.....	97
5.4.4. Uspješnost pripusta	98
5.5. Utjecaj purperija i graviditeta na izlučivanje herpesvirusa	99
5.6. Serološke pretrage istraživane populacije koza.	100
5.6.1. Rezultati imunoenzimnog testa za dokaz protutijela za CpHV-1 i interpretacija rezultata.	100
5.6.2. Rezultati imunoenzimnog testa za dokaz protutijela za artritisa encefalitis virus i interpretacija rezultata.	101
5.6. Utjecaj herpesvirusne infekcije na jarad	104
5.6.1. Mjere po porodu, masa pri odbiću, prirast i broj jaradi.....	104
5.6.3. Rezultati fetometrije	110
5.7. Dokaz herpesvirusa u mlijeku i utjecaj infekcije na mliječnost	110
6. RASPRAVA.....	113
6.1. Pojavnost i proširenost herpesvirusnih infekcija u populaciji koza.....	113
6.2. Kliničko očitovanje infekcije koza herpesvirusima	115
6.3. Pokazatelji reproduktivne učinkovitosti	118
6.4. Utjecaj herpesvirusnih infekcija na jarad po rođenju	119

7. ZAKLJUČCI	122
8. POPIS LITERATURE.....	123
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	148
9.1. Životopis	148
9.2 Popis objavljenih znanstvenih radova.....	149

POPIS KRATICA

CpHV-1 = kozji herpesvirus 1 (engl. Caprine herpesvirus 1)

CpHV-2 = kozji herpesvirus 2 (engl. Caprine herpesvirus 2)

CpLHV = kozji limfotropni herpesvirus (engl. Caprine lymphotropic herpesvirus)

OvHV-2 = ovčji herpesvirus 2 (engl. Ovine herpesvirus 2)

PCR = metoda lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)

ELISA= imunoenzimni test (engl. Enzyme Linked Immunoassay)

RH = Republika Hrvatska

MKG = maligna kataralna groznica

OvHV-1 = ovčji herpesvirus 1 (engl. Ovine herpesvirus 1)

BoHV-1 = goveđi herpesvirus 1 (engl. Bovine herpesvirus 1)

CaHV-1 = pseći herpesvirus 1 (engl. Canine alphaherpesvirus 1)

GnRH = gonadotropin otpuštajući hormon (engl. gonadotropin releasing hormone)

LH = luteinizacijski hormon

FSH = folikulo-stimulirajući hormon

UO = umjetno osjemenjivanje)

CL = žuto tijelo (lat. *corpus luteum*)

PGF_{2α} = prostaglandin F_{2α}

mm = milimetar

MOET = multipla ovulacija i embriotransfer

eCG = konjski korionski gonadotropin (engl. equine chorionic gonadotropin)

cm = centimetar

CRL = dužina od tjemena do trtice (engl. crown-to-rump lenght)

BPD = Biparijetalni promjer (engl. biparietal diameter)

RS = Fetalni međurebreni prostor (engl. rib space)

TD = mjera promjer trupa (engl. trunk diameter)

ml = milimetar

IgG = imunoglobulini skupine G (dok imunoglobulini skupine A (IgA) i M (IgM)

IgA = imunoglobulini skupine A

IgM= imunoglobulini skupine M

BVDV = virus proljeva goveda (engl. Bovine viral diarrhea virus)

kg = kilogram

CAEV = virus artritis encefalitis koza (engl. Caprine arthritis encephalitis virus)

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

SAD = Sjedinjene Američke Države

CIELISA = kompetitivni inhibicijski imunoenzimni test (engl. Competitive Inhibition-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

AlHV-1= alcelaphine herpesvirus 1

BLHV = goveđi limfotropnim herpesvirusom (engl. Bovine lymphotropic herpesvirus)

OIS = opći infektivni sindrom

SŽS = središnji živčani sustav

Mg²⁺ = magnezij

SV = srednja vrijednost

OD = optička gustoća (engl. optic density)

μl = mikrolitar

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Filogenetsko stablo izvedeno iz aminokiselinskih slijedova gB regija alphaherpesvirusa preživača

Slika 2. Prikaz filograma temeljen na djelomičnim aminokiselinskim sekvencama homolognog fragmenta gena za DNK polimerazu iz pet članova MKG skupine virusa i drugih limfocitima povezanih članova gamaherpesvirusa preživača

Slika 3. Izgled boksa na farmi jedan.

Slika 4. Izgled boksa na farmi 3.

Slika 5. Izgled epizootiološkog obrasca.

Slika 6. Primjer određivanja tjelesne kondicije u koza.

Slika 7. Dijagnostika graviditeta i uzmanje fetometrijskih mjera

Slika 8. Mjerenje porođajne težine jaradi

Slika 9. Izolirana DNA u eppendorf epruveti od 2 mililitra

Slika 10. PCR uređaj BioRad, sa protokolom za umnažanje dijela gena herpesvirusne DNK

Slika 11. Očitavanje agaroznog gela pod UV svjetlom.

Slika 12. Ulaganje ploče u spektrofotometar za očitavanje rezultata

Slika 13. Grafikon prikazuje broja limfocita s obzirom na rezultat PCR pretrage, uključujući i pasminu

Slika 14. Grafikon broja limfocita prema vrsti virusa, zajedno s pasminom.

Slika 15. Promjene zabilježene na sluznici usne šupljine u alpske koze.

Slika 16. Promjene zabilježene na sluznici usne šupljine u sanske koze.

Slika 17. Primjer erozija na prijelazu kože stidnice na sluznicu stidnice.

Slika 18. Primjer lezije na sisi vimena

Slika 19. Grafikon Prikaz opsega glave ploda u odnosu na rezultat PCR pretrage i pasminu.

Tablica 1. Rezultat PCR pretrage skupnih uzoraka briseva sluznice nosa, stidnice ili prepucija.

Tablica 2. Pojavnost dokazanih vrsta kozjih herpesvirusa

Tablica 3. Rezultati PCR pretrage obriska sluznice stidnice ili prepucija ovisno o vrsti virusa

Tablica 4. Rezultati PCR pretrage obriska sluznice nosa ovisno o vrsti virusa

Tablica 5. Rezultati PCR pretrage skupnih uzoraka obrisaka sluznice na promatranim farmama koza

Tablica 6. Pojavnost različitih vrsta herpesvirusa na promatranim farmama koza

Tablica 7. Pojavnost različitih vrsta herpesvirusa ovisno o pasmini koza

Tablica 8. Utjecaj pasmine na rezultat PCR pretrage obriska nosne sluznice

Tablica 9. Utjecaj pasmine na rezultat PCR pretrage obriska sluznice stidnice/prepucija

Tablica 10. Hematoloških parametri istraživane populacije koza

Tablica 11. Razlike u hematološkim parametrima koza između pojedinih farmi

Tablica 12. Srednja vrijednost i standardna greška promatranih hematoloških parametara za multivarijantni model analize farmi koza.

Tablica 13. Rezultati hematološke pretrage istraživane populacije koza s obzirom na nalaz PCR pretrage skupnih uzoraka.

Tablica 14. Opisni podaci hematološke pretrage istraživane populacije koza s obzirom na vrstu kozjeg herpesvirusa i negativnih koza.

Tablica 15. Tjelesne temperature i procjene tjelesne kondicije koza

Tablica 16. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije ovisno o pasmini.

Tablica 17. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije ovisno o rezultatima PCR pretrage skupnih uzoraka.

Tablica 18. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa

Tablica 19. Promjene na konjunktivama koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 20. Promjene na spojnicama kod različitih pasmina koza i značajnost uočenih razlika

Tablica 21. Promjene na spojnicama koza ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i značajnost uočenih razlika

Tablica 22. Promjene na spojnicama koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa i značajnost uočenih razlika

Tablica 23. Promjene na sluznici usta koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 24. Promjene na sluznici usta kod različitih pasmina koza i značajnost uočenih razlika

Tablica 25. Promjene na sluznici usne šupljine u koza ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i značajnost uočenih razlika

Tablica 26. Promjene na sluznici usne šupljine koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa i značajnost uočenih razlika.

Tablica 27. Promjene na sluznici stidnice koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika.

Tablica 28. Utjecaj pasmine na pojavu promjena na sluznici stidnice

Tablica 29. Utjecaj PCR rezultata na broj životinja s promjenama na sluznici stidnice

Tablica 30. Utjecaj vrste herpesvirusa na promjene na sluznici stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 31. Broj životinja s promjenama na limfnih čvorovima na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 32. Utjecaj pasmine na uočeni broj životinja s promjenama na limfnim čvorovima

Tablica 33. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s promjenama na limfnim čvorovima

Tablica 34. Utjecaj vrste virusa na promjenu limfnih čvorova i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 35. Pojava apscesa kod koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 36. Utjecaj pasmine na pojavu apscesa

Tablica 37. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s apscesima

Tablica 38. Utjecaj vrste virusa na pojavu apscesa

Tablica 39. Broj životinja s promjenama na mliječnoj žlijezdi na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 40. Utjecaj pasmine na uočeni broj životinja s promjenama mliječne žlijezde

Tablica 41. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s pojedinim promjenama na mliječnoj žlijezdi

Tablica 42. Utjecaj vrste kozjih herpesvirusa na prisutnost promjena mliječne žlijezde

Tablica 43. Prisutnost iscjetka iz nosa ili stidnice u koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 44. Utjecaj pasmine na pojavu iscjetka iz nosa ili stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 45. Utjecaj pretrage skupnog uzorka PCR metodom na broj životinja s uočenim iscjetkom i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 46. Utjecaj dokazane vrste virusa na pojavu iscjetka iz nosa i stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 47. Uginuće koza u razdoblju 2022.-2024. godine ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnih uzoraka

Tablica 48. Uginuće koza u razdoblju 2022.-2024. godine ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa

Tablica 49. Pojava preganjanja ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka koze

Tablica 50. Pojava preganjanja ovisno o vrsti dokazanog kozjeg herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 51. Utjecaj PCR rezultata jarčeva na pojavu preganjanja i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 52. Koze sa zabilježenim slučajem pobačaja ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 53. Koze sa zabilježenim slučajem pobačaja ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 54. Koze sa zabilježenim slučajem mrtvorodstva ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 55. Koze sa zabilježenim slučajem mrtvorodstva ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Tablica 56. Utjecaj rezultata PCR pretrage skupnih uzoraka na uspješnost pripusta

Tablica 57. Utjecaj dokazane vrste herpesvirusa uspješnost pripusta

Tablica 58. Udio PCR negativnih i pozitivnih koza prema razdoblju uzorkovanja.

Tablica 59. Udio negativnih i pozitivnih obrisaka sluznice nosa prema razdoblju uzorkovanja.

Tablica 60. Udio negativnih i pozitivnih obrisaka stidnice prema razdoblju uzorkovanja.

Tablica 61. Rezultati ELISA serološke pretrage za dokaz CpHV-1 protutijela u serumu koza

Tablica 62. Koze s pozitivnim i negativnim nalazom PCR pretrage skupnih uzoraka ovisno o serološkom statusu za CpHV-1

Tablica 63. Koze s dokazom različitih vrsta herpesvirusa u odnosu na serološki status CpHV-1

Tablica 64. Prikaz broja serološki pozitivnih i negativnih koza na artritis encefalitis virus

Tablica 65. Utjecaj artritis encefalitisa na promjenu hematoloških parametara u koza.

Tablica 66. Utjecaj artritis encefalitis virusa na promjene mliječne žlijezde

Tablica 67. Utjecaj PCR rezultata na serološki status artritis encefalitis virusa.

Tablica 68. Utjecaj vrste virusa na serološki status artritis encefalitis virusa

Tablica 69. Utjecaj artritis encefalitis virusa na porođajnu masu i masu pri odbiću jaradi, prirast i broj rođene jaradi po kozi.

Tablica 70. Prikupljeni podaci mjera vanjštine jaradi po porodu i porođajna masa, sa razlikama između farmi.

Tablica 71. Prikupljeni podaci mjere vanjštine jaradi, broja jaradi, porođajne mase i mase pri odbiću razvrstani prema vrsti kozjeg herpesirusa.

Tablica 72. Tjelesne mjere jaradi zajedno s porođajnom masom analizirane u odnosu na rezultat PCR pretrage, mjesto izlučivanja virusa i prisutnost uzročnika u mlijeku.

Tablica 73. Prikupljeni podaci mjere vanjštine jaradi, broja jaradi, porođajne mase i mase pri odbiću razvrstani prema vrsti kozjeg herpesirusa.

Tablica 74. Utjecaj vrste virusa na mjere vanjštine jaradi, porođajnu masu i masu po odbiću, prirast, broj jaradi i na trajanje gravidnosti.

Tablica 75. Utjecaj vrste virusa na prirast jaradi odvojen po spolu

Tablica 76. Koze razvrstane u dvije dobne kategorije i razlike između promatranih parametara vezanih uz jarad, u odnosu na rezultat PCR pretrage i vrstu virusa.

Tablica 77. Analiza PCR rezultata jarčeva s obzirom na parametre vezane uz jarad.

Tablica 78. Rezultati pretrage mlijeka PCR metodom

Tablica 79. Udio negativnih i pozitivnih koza iz uzorka mlijeka prema razdoblju uzorkovanja.

Tablica 80. Udio pozitivnih i negativnih iz uzoraka mlijeka pretraženih PCR pretragom prema farmama.

Tablica 81. Pojedini parametri analize mlijeka u odnosu na PCR pretragu i vrstu herpesvirusa.

1. UVOD

Prema Godišnjem izvješću za ovčarstvo, kozarstvo i male životinje za 2023. godinu, kozarstvo ukupan broj koza na kraju 2023. godine bio je 62.748, od čega je uzgojno valjanih 7.804 grla (ANONYMOUS, 2023.). U odnosu na prethodnu godinu ukupan broj uzgojno valjanih koza je manji za 4,7 %, te je nastavljen trend pada broja od 2021. godine. Najveći broj životinja je u sjeverozapadnim dijelovima RH, u Varaždinskoj i Međimurskoj županiji, s najvećim brojem grla pasmine alpina. Učinkovitost uzgoja je određena uspješnim reproduktivnim parametrima (ALEMAYEHU i sur., 2021.). Obzirom na sezonsku poliestričnost koza, kao pokazatelji reproduktivne uspješnosti uzimaju se podaci o broju ojarane jaradi, dobi pri prvom jarenju, razmaku između jarenja, postotku jarenja, pobačaja i odbijene jaradi (ALEMAYEHU i sur., 2021.). Gubici jaradi se uobičajeno izražavaju kao postotak mrtvorodne i postotak jaradi koja uginu prije odbića (MELLADO i sur., 2004.; MELLADO i sur., 2006.). Uzroci smanjene reproduktivne uspješnosti su brojni, a neovisno o vrsti domaćih životinja infekcije zauzimaju značajno mjesto među njima.

Poznato je da porodica *Herpesviridae* može uzrokovati reproduktivne poremetnje uzrokujući pobačaje u mnogih vrsta domaćih životinja te zahvaća i živčani i žljezdani sustav (ADAMS i CARSTENS, 2012.). Do danas je poznato 138 vrsta herpesvirusa. Cijela porodica herpesvirusa podijeljena je na tri podporodice: alfaherpesvirusi, betaherpesvirusi i gamaherpesvirusi. Alfaherpesvirusi imaju velik broj mogućih domaćina te ova porodica uključuje rod *Varicellovirus* koji u veterini imaju najveće značenje. Virusi iz te skupine imaju kratak replikacijski ciklus (24 sata) pa obično naglo prouzroče razaranje stanica, a značajka im je da redovito ostaju trajno latentni u živčanim stanicama. Betaherpesvirusi imaju manji značaj u veterinarskoj medicini. Gamaherpesvirusi uključuju razmjerno malu skupinu virusa koji prouzrokuju malignu kataralnu groznicu (MKG) u goveda, ovaca, jelena i drugih preživača.

Goveđi herpesvirus 1 (BoHV-1) povezan je sa smanjenjem mliječnosti u subkliničkim infekcijama seronegativnih jedinki koje serokonvertiraju (HAGE i sur., 1998.). Poznato je da uzorkuje i nekoliko sindroma (zarazni goveđi rinotraheitis, zarazni pustularni vulvovaginitis/balanopostitis te fatalnu multisustavnu infekciju u mladunčadi).

U fazi viremije, latentno prisutni BoHV-1 dolazi i do reproduktivnih organa te fetusa (CHASE i sur., 2017.) utječući na koncepciju, koncentraciju progesterona (MILLER i VAN der MAATEN, 1987.), uzrokujući prolaznu neplodnost, embrionalnu smrtnost i pobačaje (CHASE i sur., 2017.; QUEIROZ-CASTRO i sur., 2019.). Sam mehanizam prijenosa virusa s krave na plod još nije razjašnjen iako je najvjerojatnije riječ o uteroplancentalnom prijenosu zahvaljujući epiteliotropnosti samog virusa, i/ili prijenosom iz tkiva maternice i vezanjem za zonu pellucidu na jajnoj stanici (QUEIROZ-CASTRO i sur., 2019.). Nadalje, kod pasa je poznat negativan učinak na reprodukciju posljedično infekciji herpesvirusom kanida (engl. canide herpesvirus 1, CaHV-1) (GREENE i CARMICHEL, 2006.). Osim promjena na sluznici spolnih organa u oba spola, kod kuja se, osim kao neplodnost i nemogućnost koncipiranja, infekcija očituje pobačajem, mumifikacijom plodova, mrtvorodenim štenadi, malim leglima te preranim štenjenjem (HASHIMOTO i sur., 1983.; EVERMAN, 1989.). Kod štenadi je najčešće riječ o septikemijskoj infekciji sa čestim smrtnih ishodom u prva tri tjedna po rođenju (GREENE i CARMICHEL, 2006.). Nakon infekcije, neovisno o kliničkim znakovima, životinje ostaju doživotno latentno inficirane, a do reaktivacije dolazi u stanjima vezanima za stres, uključujući gravidnost (MIYOSHI i sur., 1990.; GREENE i CARMICHEL, 2006.), ali i početak spolnog ciklusa, tj. proestrus i estrus (POSTE i KING, 1971.).

Koze su rezervoari ovčjeg herpesvirusa 2 (engl. Ovine herpesvirus 2, OvHV-2) i kozjeg herpesvirusa 2 (engl. Caprine herpesvirus 2, CpHV-2), koji kod drugih osjetljivih vrsta uzrokuju MKG. Prvi gamaherpesvirus otkriven kod koza, nazvan je kozji herpesvirus-2 (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). Nakon CpHV-2 otkriven je još jedan kozji gamaherpesvirus koji je nazvan kozjim limfotropnim herpesvirusom (engl. Caprine lymphotropic herpesvirus, CpLHV) (LI i sur., 2001.). Još poznati herpesvirusi malih preživača su kozji herpesvirus 1 (engl. Caprine herpesvirus 1, CpHV-1), iz porodice alfaherpesvirusa, te ovčji herpesvirus 1 (engl. Ovine herpesvirus 1, OvHV-1) koji je prema zadnjim istraživanjima svrstan u rod Macavirus gamaherpesvirusa (ŽIAK i sur., 2014.). Uz CpHV-2 i OvHV-2 CpLHV se smatra enzoonotskim gammaherpesvirusom u stadima koza (CHMIELEWICZ i sur., 2001.).

Dosadašnje spoznaje o kozjim herpesvirusima proizašle su iz praćenja MKG-a, dok su prve eksperimentalne studije počele u prvoj trećini 20. stoljeća (DAUBNEY i

HUDSON, 1936.). OvHV-2, koji postoji kao sveprisutna infekcija domaćih ovaca (*Ovis aries*), zbog kozmopolitske rasprostranjenosti ovaca odgovoran za većinu slučajeva MKG-a u svijetu (LI i sur., 2001.; AAYESHA i sur., 2021). Mnogim istraživanjima, uzorkovanjem ovaca i koza te goveda koji su zajedno kohabitirali na pašnjacima, potvrđena je povezanost CpHV-2 (CHMIELEWICZ i sur., 2001.; LI i sur., 2001.), ali i CpLHV s pojavom MKG (LI i sur., 2001.).

Kao uzročnik reproduktivnih problema u zadnjih desetak godina se u koza izdvaja kozji herpesvirus 1 (eng. Caprine herpes virus 1; CpHV-1). U tri stada s dokazom infekcije CpHV-1 u Sjevernoj Americi, UZAL i sur., (2004.), opisuju pojavu pobačaja, vulvovaginitisa, balanopostitisa i respiratorne poteškoće kao moguće kliničke znakove bolesti, iako ih većina prolazi subklinički. Novija serološka istraživanja ukazuju na veće prisustvo infekcija u mediteranskim zemljama, poput Španjolske, Italije i Grčke, sa seroprevalencijom od 30-40% (TEMPESTA i sur., 2001.; SUAVET i sur., 2016.). S obzirom na ulazna vrata virusa te izlučivanje preko sluznica reproduktivnog sustava, spolni put se smatra najvažnijim za prijenos infekcije (TEMPESTA i sur., 2002.), a dokazan je i učinak estrusa, među ostalima, kao rizičnog čimbenika za nastup infekcije (SUAVET i sur., 2016.). Virus je dokazan i kao uzročnik ne samo pobačaja već i jarenja avitalne jaradi (WILLIAMS i sur., 1997.), iako nije dokazan prijenos virusa s odraslih jedinki na jarad (MCCOY i sur., 2007.).

U Republici Hrvatskoj podaci o proširenosti herpesvirusnih infekcija u koza su vrlo oskudni. Prema MATIJEVIĆ, (2022.), prevalencija herpesvirusa koza u RH na području Gline je iznosila od 9,8 do 11,6%. Iako postoje brojna istraživanja o utjecaju herpesvirusnih infekcija na reprodukciju u različitim vrsta domaćih životinja o njihovom utjecaju na reprodukciju koza, osim ograničenih istraživanja CpHV-1, ne postoje podaci.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. FIZIOLOGIJA RASPLOĐIVANJA KOZA

2.1.1. Spolni ciklus koza

Spolni, odnosno estrusni ciklus definira se kao vremensko razdoblje između dva uzastopna estrusa (MIOČ i PAVIĆ, 2002.; FATET i sur., 2011.). Koze su u području umjereno kontinentalne klime sezonski poliestrične životinje (engl. short day breeders) sa sezonalnošću vezanom za kratke dane. Početak i trajanje sezone ovise o mnogim čimebnicima, poput pasmine, klime, fiziološkog statusa jednike, utjecaja mužjaka, sustava uzgoja i fotoperioda (LUO i sur., 2019.). Anestrus se na sjevernoj polutki većinom javlja tijekom proljeća (travanj, svibanj). Spolni ciklus traje 20-21 dan, a fiziološki raspon iznosi od 18 do 22 dana. Na početku i kraju rasplodne sezone mogući su i kratki ciklusi u trajanju od pet do sedam dana (SMITH, 1997.). Estrus traje 24-72 sati, najčešće 36 sati, a ovulacija se javlja pred kraj estrusa, 30 do 36 sati od početka estrusa (MELLADO i sur., 2016.; GRIZELJ i sur., 2022a, 2022b.). Koze ovuliraju jednu do tri jajne stanice tokom estrusa (LUO i sur., 2019.; GREYLING, 2010.). Obično rađaju više od jednog ploda, a gravidnost traje 149 dana (144-156 dana) (MOBINI i sur., 2002.). Jarad se najčešće rađa u proljeće, kad je prirodno najveća dostupnost hrane i pogodna je vanjska temperatura (GRIZELJ i sur., 2011.).

Duljina dana utječe na sezonu parenja i u ovaca i koza (SHELTON, 1978.; LEGAN i KARSCH, 1980.; KARSCH i sur., 1984.), preko melatonina, koji se smatra glasnikom duljine dana. Naime, dulje trajanje noći rezultirat će duljim izlučivanjem melatonina koji će preko kisspeptina potaknuti hipotalamus na izlučivanje gonadotropin otpuštajućeg hormona (engl. gonadotropin releasing hormone, GnRH). GnRH se putem hipotalamično-hipofiznog portalnog sustava transportira do adenohipofize koja je odgovorna za izlučivanje gonadotropnih hormona: luteinizacijskog hormona (LH) i folikulo-stimulirajućeg hormona (FSH). LH u mužjaka potiče testise na izlučivanje testosterona, a u ženki potiče izlučivanje estrogena i progesterona (CHEMINEAU i DELGADILLO, 1994.). Folikulo-stimulirajući hormon potiče rast folikula na jajnicima.

Stoga se na spolni ciklus koza i ovaca može utjecati i manipulacijom svjetlosnog režima (LEGAN i KARSCH, 1980.; KENNAWAY i sur., 1983.). Osim dužine dana, tj, fotoperioda, na ciklus utječe i temperatura i količina padalina, pasmina koza, hranidba, zdravstveni status te nazočnost jarca (SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Spolni ciklus u koza traje 18-22 dana, folikularna faza traje tri do četiri dana, dok lutealna faza traje oko 17 dana (ZARKAWI i SOUKOUTI, 2001.; GRIZELJ i sur., 2011.). Spolni ciklus se sastoji četiri faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus. Proestrus i estrus se zajedno čine folikularnu fazu, a metestrus i diestrus lutealnu fazu. Nadalje, ovisno o promjenama na jajovodima, maternici i rodnici, proestrus i estrus se mogu definirati i kao proliferativna, a metestrus i diestrus kao sekrecijska faza. U našim krajevima, sezona spolne aktivnosti koza traje od završetka kolovoza do kraja prosinca, s vidljivim anestrusom od veljače do svibnja (CORTEEL, 1977.; SHELTON, 1978.; CHEMINEAU i sur., 1992.). Proestrus je kratko razdoblje pojačane aktivnosti spolnih organa. Kao posljedica lučenja estrogena iz folikula, na endometriju se javlja kongestija i edem, sluznica rodnice je hiperemična te se povećava broj slojeva stanica u njenom epitelu, a površinski sloj orožnjava. Njegovo trajanje je jedan do dva dana, dok u mlađih koza traje kraće. Estrus je razdoblje spolnog žara odnosno faza u kojoj se koza mrče i spremna je za pripust odnosno osjemenjivanje. Koze tijekom mrkanja pokazuju interes za mužjakom, njuškaju ga, mašu repom, mekeću, uriniraju blizu mužjaka, stidnica im je edematozna te se pojavljuje manja količina vaginalnog iscjetka, može doći do prolaznog pada apetita i mliječnosti (ROMANO i FERNANDEZ ABELLA, 1997.; SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Također, mijenja se ponašanje iz proceptivnog u receptivno odnosno iz ponašanja traženja mužjaka i iskazivanje interesa u prihvatanje naskakivanja i parenja u punom estrusu (GRIZELJ i sur., 2011.). Osim što koze mijenjaju ponašanje, mijenjaju ga i jarci, koji intenzivno pokazuju flehmen reakciju. To je reakcija u kojoj mužjak zavrne gornju usnicu prema gore i udahne zrak koji sadrži feromone kroz Jakobov, odnosno vomeronazalni organ. Osim flehmen reakcije jarčevi i mekeću te pokušavaju zaskočiti koze koje su u estrusu. (GELEZ i FABRENYS, 2004.). Kvaliteta estrusne vaginalne sluzi mijenja se tijekom trajanja mrkanja što veterinarima ponekad, u slučaju provođenja umjetnog osjemenjivanja (UO) bez prethodne hormonalne sinkronizacije, predstavlja važan orijentir za određivanje optimalnog vremena za UO. Sluz je prozirna i rijetka na početku tjeranja, kasnije se zamućuje i postaje ljepljiva da bi na kraju mrkanja postala sirasta

(SAMARDŽIJA i sur., 2010.; GRIZELJ i sur., 2011.). U estrusu dolazi do daljnjeg povećanja količine estrogenih hormona što će za posljedicu imati ovulaciju. Njegovo trajanje ovisit će o broju ovulacija i trajat će dulje ako koza ovulira više folikula. Broj ovuliranih jajnih stanica povećava se s vremenom i svoj vrhunac dostiže u koza između treće i šeste godine života. Broj ovuliranih jajnih stanica ovisi o dobi koze, pasmini, reproduktivnom i hranidbenom statusu, godišnjem dobu i gojnom stanju. Tako će se sredinom pripusne sezone javljati najviše ovulacija u koza držanih na pravilnom hranidbenom režimu odnosno onih u kojih je primjenjen tzv. flushing (NUGROHO i sur., 2021.), tj. pojačan režim ishrane u razdoblju neposredno prije početka rasplodne sezone.

Nakon estrusa slijedi metestrus u kojem dolazi do stvaranja žutog tijela, odnosno *corpus luteum* (CL) pod utjecajem LH i prolaktina. Zatim slijedi diestrus, odnosno razdoblje aktivnosti žutog tijela i traje 13 do 14 dana (SAMARDŽIJA i sur., 2010; FATET i sur., 2011.). U ovoj fazi žuto tijelo sazrijeva, izlučuje velike količine progesterona, a maternica se priprema za prihvata zametka. Ukoliko ne dođe do oplodnje, dolazi do lučenja prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) iz endometrija i posljedične luteolize odnosno regresije žutog tijela i smanjenja količine progesterona. Ukoliko je došlo do oplodnje, neće doći do regresije žutog tijela već će ono i dalje izlučivati progesteron što će u koza održavati graviditet do porođaja (FATET i sur., 2011.).

2.1.2. Folikularna dinamika

Spolni ciklus može se podijeliti u dvije faze: folikularnu, koja traje tri do četiri dana, i lutealnu, koja traje 17 dana (GRIZELJ i sur., 2011.). Folikularna faza odnosi se na nastanak ovulatornog folikula i uključuje sazrijevanje gonadotropin-ovisnog folikula do ovulacije (terminacija). Tijekom procesa odabira dominantnih folikula kod uniparnih životinja, zbog različite osjetljivosti folikula na povećanje koncentracije gonadotropina, izabire se nekoliko osjetljivih folikula. Djelovanjem FSH-a, ti osjetljivi folikuli povećavaju broj granulosa stanica i volumen folikularne tekućine, što rezultira rastom folikula. Proces regrutacije, razvoja, odabira i ovulacije folikula su primarni čimbenici koji utječu na plodnost koza. Tijekom razvoja folikula, regrutacija primordijalnih folikula, razvoj preantralnih folikula, odabir antralnih folikula, te sazrijevanje i ovulacija dominantnih folikula su ključni čimbenici koji određuju broj i kvalitetu oocita te igraju

ključnu ulogu u određivanju postotka koncepcije i broja mladunčadi kod koza (LEBOEUF i sur., 2008.). FSH izlučen iz hipofize potiče razvoj folikula, omogućavajući odabir kohorte gonadotropin-ovisnih antralnih folikula veličine 2-3 mm u promjeru koji počinju rasti. Samo dva do tri takva folikula dosegnu promjer od četiri mm, čime se vrši selekcija i ulazak u fazu dominacije.

Pod utjecajem LH, dominantni folikuli postižu preovularnu veličinu (šest do devet mm u promjeru), dok manji folikuli degeneriraju i atreziraju (NAGAMALLESWARI i sur., 2004.). Degeneracija i atrezija dominantnih folikula se događa i za vrijeme lutealne faze, dok je visoka koncentracija progesterona. Prestankom dominacije počinje novi folikularni val. Dakle, rast folikula slijedi valovit uzorak tijekom ciklusa jer ovisi o lučenju hormona i koncentraciji progesterona, a karakterizira ga redoslijed od tri događaja ovisna o gonadotropinima: odabir, selekcija i dominacija (DRIANCOURT 2001.). Posljednji val koji se razvija za vrijeme folikularne faze, po luteolizi i padu koncentracije progesterona, rezultira ovulacijom dominantnih folikula. Istraživanja pri kojima se činio višestruki uzastopni pregled ultrazvukom ukazuju na postojanje između dva i šest folikularnih valova tijekom spolnog ciklusa koza, a najčešći su spolni ciklusi sa tri ili četiri vala (EVANS 2003.; SIMÕES i sur., 2006.).

2.1.3. Sezonalnost mužjaka

Mužjaci također pokazuju velike promjene u spolnoj aktivnosti. Sezona razmnožavanja mliječnih jaraca počinje rano jeseni i završava kasno zimi. Spolno ponašanje, veličina testisa, indeks spermatogenetske aktivnosti te kvantitativna i kvalitativna proizvodnja sperme jaraca dramatično opada tijekom razdoblja spolnog mirovanja. Procjena reproduktivnih funkcija mliječnih jaraca obično se provodi u dobi između sedam i devet mjeseci starosti u pojedinačnom boksu s 15 prikupljanja ejakulata tijekom početka sezone parenja. Pri tome se kod mladih jarčeva ejakulat prikupljava dva puta tjedno, dok se zrelim jarčevima može prikupljati od tri do pet puta tjedno (SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

2.1.4. Nastup puberteta

U intenzivnim uzgijima, šilježice bi trebale ući u pubertet sa sedam mjeseci i jariti se prvi put u dobi od 12-14 mjeseci, što mora biti popraćeno i radom na selekciji i adekvatnom hranidbom (MELLADO, 2016). Većina koza ulazi u pubertet u ranoj dobi od šest do osam mjeseci (SMITH, 2007), a mužjake bi trebalo odvojiti od ženki u dobi od pet mjeseci (SHELTON, 1987.). Iako fotoperiod ima utjecaj na nastup puberteta, šilježice se ne bi trebale pripuštati dok ne dosegnu minimalno 60-70 % svoje odrasle težine (MOBINI, 2000.; GREYLING, 2010.; CLUNE i sur., 2021.). Prerano pripuštanje kasnije ojarenih jedinki rezultira manjim tjelesnim okvirom, što može utjecati na prolićnost jedinke tokom života, na njenu smanjenu produktivnost, ali i na veličinu legla.

2.2. DRŽANJE KOZA

Koze mliječnih pasmina se u RH u pravilu drže u poluintenzivnim uvjetima, koji uključuju boravak na paši, ili u posve intenzivnim uvjetima uzgoja. Izvori stresa kod koza su mnogobrojni, uključujući ograničavanje boksevima, upravljanje stajama, transport, promjene sezona, visoke temperature, nepoznate okoline i slično. Nakon dugotrajne izloženosti stresu, koze razvijaju fiziološke mehanizme koji im omogućuju toleranciju na stres. Stres uzrokuje promjene u ponašanju i fiziologiji te aktivaciju adrenomedularnog odgovora putem oslobađanja hormona kateholamina (adrenalin i noradrenalin) koji pojačavaju brzinu otkucaja srca, tonus mišića, krvni tlak i druge fiziološke i ponašajne promjene koje omogućavaju životinji da izdrži stresne situacije. Drugi hormonski odgovor pokreće se unutar nekoliko minuta od početka stresa, što dovodi do sinteze i oslobađanja glukokortikoida (kortizola ili kortikosterona) koji imaju širok raspon učinaka na imunološki i reproduktivni sustav (KRUGER i sur., 2016.). SO-IN i SUNTHAMALA (2023.), dokazuju da postoje razlike između ekstenzivnog, poluekstenzivnog i intenzivnog (farmskog) držanja koza, te da su koze držane intenzivno u skupini najizloženijoj stresu a time i podložnije infekcijama odnosno parazitarnim infestacijama.

2.3. TEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA KOZA

Asistirana reprodukcija podrazumijeva metode kojima u kontroliranim uvjetima rasplodujemo životinje, utječući na poboljšanje plodnosti i odabirući poželjna genetska svojstva, prema željenim proizvodnim osobinama (MAPLETOFT i HASLER, 2005.; LUO i sur., 2019.). Osim broja, naglasak se stavlja i na kvalitetu dobivenog potomstva.. Generacije asistirane reprodukcije su umjetno osjemenjivanje (UO), multipla ovulacija i embriotransfer (MOET), proizvodnja zametaka *in vitro* te dijeljenje zametaka, kloniranje i transgeneza (AMIRIDIS i CSEH, 2012.). Asistirana reprodukcija, odnosno biotehnologija rasplodivanja omogućava genetski napredak stada gdje se dobiva veliki broj potomaka od najkvalitetnijih životinja, olakšava mogućnost međunarodnog transporta, trgovine sjemena i smrznutih zametaka, smanjuje rizik širenja zaraznih bolesti te povećava ponuda visokokvalitetne genetike (SAMARDŽIJA i sur., 2010.; AMIRIDIS i CSEH, 2012.). U kozarstvu u RH od minornog je značaja korištenje UO-a, dok se ostale metode asistirane reprodukcije u pravilu koriste samo za očuvanje autohtonih pasmina.

2.3.1. Prirodni pripust

U RH, prirodni pripust ostaje najčešće korištena metoda parenja u koza. Razlikuje se nekoliko metoda prirodnog pripusta: metoda divljeg parenja, metoda klasnog parenja, metoda haremskog parenja i metoda skoka iz ruke. Razlikuju se u mjeri kojom se kontrolira datum parenja, ali i načinu i detaljnosti evidencije sparivanja jarčeva sa kozama, u svrhu poznavanja očinstva ali i organizacije jarenja. Kod metode divljeg parenja nema nikakve evidencije, i najviše se koristi u posve ekstenzivnim sustavima držanja životinja. Obzirom na nedostatak managementa, minimalno je potreban jedan mužjak na 20-25 ženki. Kod klasnog parenja se odabiru ženke na temelju poželjnih svojstava, i pridružuju se mužjacima ali bez daljnjeg bilježenja datuma parenja ili očinstva. Grupira se 30-35 koza s jednim mužjakom. U haremskom sustavu, isključivo jedan jarac boravi sa skupinom od 20 do 50 koza. Prednost u odnosu na prva dva načina jest poznavanje očinstva, ali i dalje se ne zna datum pripusta i sezona jarenja je široka. Metodom skoka iz ruke koze se pare sa točno odabranim mužjakom u optimalno vrijeme u odnosu na estrus i ovulaciju. U ovom slučaju mužjaci se racionalnije iskorištavaju, pozanato je očinstvo potomaka, kao i vrijeme pripusta i očekivano vrijeme porođaja.

Jedan mužjak se tijekom sezone može pariti s 50 do 80 ženki (SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

2.3.2. Umjetno osjemenjivanje

Umjetno osjemenjivanje je prva generacija biotehnologije rasplodivanja kojim je postignuto veliki napredak u odnosu na pripust. Zbog kontrole zdravlja rasplodnjaka i kvalitete ejakulata povećan je postotak koncepcije i mužjaci se racionalnije eksploatiraju. Nadalje, smanjen je prijenos zaraznih bolesti, omogućeno je ubrzano genetsko unaprijeđenje stada korištenjem sjemena superiornijih mužjaka te je olakšan transport sjemena visokovrijednih jedinki na veće udaljenosti (SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Nažalost, u Republici Hrvatskoj se gotovo i ne koristi.

2.3.3. Reproductivni menadžment

Obzirom na sezonalnost reprodukcije, i sve veću potrebu tržišta za stalnom opskrbom kozjim proizvodima, suvremeno kozarstvo je nezamislivo bez korištenja reproduktivnog menadžmenta, s naglaskom na mogućnost reprodukcije u prijelaznom razdoblju i/ili van sezone. Moguće je korištenje hormonalnih i nehormonalnih metoda sinkronizacije spolnog ciklusa (GRIZELJ i sur., 2011.).

Hormonalne metode se baziraju na primjeni gestagenskih preparata, prostagladina, melatonina i njihovih kombinacija (ABECIA i sur., 2011.; ABECIA i sur., 2012.; GONZALEZ- MALDONADO i sur., 2021.). Gestageni se najčešće koriste u vidu vaginalnih spužvica ili implantanata, a mogu se koristiti i za vrijeme i van sezone. Razlikuju se po korištenom sintetskom analogu progesterona i duljini trajanja izloženosti gestagenima (ABECIA i sur., 2011.). Van sezone bitno je uvesti mužjake odmah po prestanku djelovanja gestagena, tj. po vađenju spužvica, a preporuča se aplicirati i PGF2 α i analoge GnRH ili FSH, kako bi se potaknuo rast folikula (GONZALEZ- MALDONADO i sur., 2021.). Osim gestagena, koriste se i aplikacije prostaglandina, najčešće dvokratne (ABECIA i sur., 2011.; ABECIA i sur., 2012.; GONZALEZ-MALDONADO i sur., 2021.), te hormonalni protokoli sa kombinacijama GnRH i PGF2 α (HOLTZ i sur., 2008., ŠPOLJARIĆ i sur., 2017.)

Od nehormonalnih metoda, primjenu imaju svjetlosni režimi te korištenje utjecaja mužjaka. Primjenom svjetlosnih režima koji omogućuju umjetnu izmjenu dugih i kratkih dana moguće je manipulirati spolnom aktivnošću koza i izazvati pojavu spolne aktivnosti u razdoblju anestrusa ili u prijelaznom razdoblju kad se spolna sezona avansira (GRIZELJ i sur., 2011). Koze se prvo izlažu dugim danima, sa 16 sati svjetla po danu, i nakon 8-12 tjedana se izlažu kratkim danima, sa osam sati svjetla po danu, u trajanju 8-12 tjedana, nakon čega kreće sezona parenja. Ovisno o početku tretmana kratkim danima, moguće je koristiti i implantante melatonina nakon završetka tretmana dugim danima (CHEMINEOU i sur., 1992.). Alternativno, "utjecaj mužjaka" (engl. male effect) može biti učinkovit način za indukciju estrusa. Podrazumijeva naglo uvođenje mužjaka u stado u prijelaznom razdoblju, nakon minimalno četiri tjedna potpune razdvojenosti. Prvi estrus koji nastupi 2-3 dana po uvođenju mužjaka je obično kratak i neplodan, a plodni estrusi se javljaju sinkrono pet do 11 dana po uvođenju mužjaka.. Bitan je i omjer od jednog jarca na 10 koza (GRIZELJ i sur., 2011.).

Iako je postotak estrusa dosta visok kod svih spomenutih metoda (u prosjeku iznad 90 %, a i do 100 % u kombinaciji medroksiprogesteron acetata i eCG-a (engl. equine chorionic gonadotropin, konjski korionski gonadotropin)), pototak koncepcije varira od 50 do 80 %, ovisno o korištenom protokolu (MELLADO, 2016.; PELLICER-RUBIO i sur., 2018.). Mnogi od ovih protokola omogućuju i parenje iz ruke, ali i umjetno osjemenjivanje (PELLICER-RUBIO i sur., 2018.; GONZALEZ-MALDONADO i sur., 2021.). Metode otkrivanja mrkanja na farmi najčešće se svode na jarčeve probače opremljene pregačama s bojom koji se uvode u odjeljke sa ženkama, ili one na putu do izmuzišta prolaze pokraj odjeljka s mužjacima te se u slučaju mrkanja zaustavljaju i pokazuju interes za mužjakom (GRIZELJ i sur., 2015.). Nadalje, koristan je pregled vanjskih spolnih organa u izmuzištu (edem stidnice, iscjedak) tijekom mužnje. Unatoč sezonalnosti reprodukcije, visoka razina plodnosti (71% do 78% jarenja) se, prema PELLICER-RUBIO i sur., (2008.) može ostvariti koristeći tretman koza s umjetnim dugim danima i aplikacijom gestagena, te umjetnim osjemenjivanjem duboko smrznutim sjemenom 52 sata nakon uvođenja jarca opremljenog pregačom.

2.4. GRAVIDITET

Graviditet u koza traje od 140 do 156 dana. Prva trećina, kojoj odgovara razdoblje prvog mjeseca graviditeta, započinje oplodnjom. Za ovo vrijeme dolazi do implantacije zametka, razvoja plodnih ovojnica i naglog rasta samog embrija. Neophodan je proces majčinskog prepoznavanja gravidnosti kako bi se prevenirala luteoliza, a time i prekinuo graviditet. Do centralne implantacije embrija u endometrij dolazi između 15. i 18. dana (EDMONDSON i SHIPLEY, 2021.; SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

Nakon implantacije, u drugoj trećini graviditeta, koja obuhvaća drugi i treći mjesec gravidnosti, dolazi do značajnoga rasta i razvoja posteljice, te ona naraste do svoje konačne veličine (FLINN i sur., 2020.; WINTER i PHYTHIAN, 2013.). Posteljica koza spada u tzv. prislonjene placente, *placenta apposita*, kod kojih epitel korionskih resica priliježe uz maternični epitel. Prema složenosti placentalne barijere, riječ je o *placenta synepitheliochorialis* (PASTOR-FERNÁNDEZ i sur., 2021.), gdje se korionske resice vežu za endometrij na mjestima gdje se gubi maternični epitel,. Prema razvijenosti korionskih resica placenta preživača spada u *placenta multiplex*. Korionske resice nalaze se na određenim mjestima, tzv. kotiledonima, a njima nasuprot na endometriju su karunkuli, dobro vaskularizirana mjesta bez materničnih žlijezda. Spajanjem jednih s drugima nastaju placentomi, (KOZARIĆ, 1997.), kojih u koza ima oko 160 do 180 (GORDON, 2017.). U ovom razdoblju iznimno je važna visoka razina progesterona koja sprječava kontrakcije maternice te stimulira pojačano lučenje endometrijalnih žlijezda što je potrebno za daljnji razvoj embrija. Kod koza je CL glavni izvor progesterona tokom cijele gravidnosti (SENGER, 2015.; EDMONDSON i SHIPLEY, 2021.). Razina progesterona raste za vrijeme gravidnosti a nagli pad se opaža pred sam porod, kada raste koncentracija estrogena (SENGER, 2015.). U drugoj trećini graviditeta dolazi do organogeneze, najosjetljivijega razdoblja graviditeta.

Zadnja trećina, u koju se ubraja četvrti i peti mjesec gravidnosti, je vrijeme izrazitog fetalnoga rasta (WINTER i PHYTHIAN, 2013.). Osnovna diferencijacija ploda je završena, a nagla povećanja u masi i veličini ploda mogu znatno opteretiti organizam rodilje (EDMONDSON i SHIPLEY, 2021.; SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Iznimno je

važna razina estrogena kojega proizvodi posteljica. Pred porod estrogen doseže maskimalnu koncentraciju, a po porodu naglo pada (SENGER, 2015.).

Na trajanje graviditeta, osim pasmine i nasljednih svojstava, utječu i hranidba, način držanja životinja, podneblje u kojemu ih se uzgaja, ali i broj plodova koje roditeljica nosi. Koze su pluriparne te češće u leglu imaju po dva ili tri jareta.

2.4.1. Dijagnostika graviditeta

Dijagnostika graviditeta u koza neophodna je za bolju učinkovitost i menadžment reprodukcije (DOIZE i sur., 1997.), daje uvid u stopu koncepcije (MATSAS, 2007.), tijekom gravidnosti (AMER, 2010.), vrijeme zasušivanja i termin poroda (DOIZE i sur. 1997.; GONZÁLEZ i sur., 2004.). Odvajanje gravidnih od negravidnih jedinki umanjuje broj pobačaja, mrtvorodne jaradi ili žive, no avitalne jaradi (WANI i sur., 1998.). Upotreba precizne i lako primjenjive metode dijagnostike graviditeta omogućuje ponovno osjemenjivanje, parenje ili izlučivanje iz uzgoja negravidnih jedinki (AMER, 2010.). Za dijagnostiku graviditeta koriste se brojne metode, te se razlikuju u preciznosti i primjenjivosti u terenskim uvjetima. Poželjne su metode koje su lakoizvedive, pouzdane, financijski povoljne i visoko precizne. KAREN i sur., (2001.), spominju podjelu na manje upotrebljive metode: non-return (eng. bez povrata, tj jedinka ne ulazi u estrus te se time smatra gravidnom), palpacija abdomena i balotment, palpacija *arteriae uterinae caudalis*, laparotomija, peritoneoskopija i inhibicijski test rozetom prema Ishwaru; a drugu skupinu obuhvaćaju više upotrebljive metode: radiografija, digitorektalna palpacija abdomena, mjerenje razine hormona i specifičnih proteina tijekom graviditeta i ultrasonografija. Radiografski nakon 70. dana gestacije sa 94-100% točnošću može se utvrditi graviditet, međutim zbog zračenja i terenskih uvjeta, manje se koristi u svakodnevnoj upotrebi. Digitorektalnom palpacijom može se utvrditi povećani maternični grljak, prepubična lokacija maternice, palpacija placentoma, dijelova ploda i asimetrija. Metoda je subjektivna, time podložna krivoj procjeni.

Ultrazvučna dijagnostika se često koristi u upravljanju stočarstvom za otkrivanje estrusa i dijagnosticiranje graviditeta zbog svoje jednostavne tehnike, niske cijene izvođenja po životinji, brzine izvođenja pregleda (jedna do dvije minute po životinji uz iskusnog tehničara) i trenutnih rezultata. Nedavni napredci u tehnologiji ultrazvuka poboljšali su

jasnoću slike i prenosivost ultrazvučnih aparata te se time povećala i korisnost ovog alata u terenskom i istraživačkom radu. U koza, dijagnoza graviditeta posebno je važna zbog relativno kratkog trajanja gestacije (prosječno 147 dana) u usporedbi s drugim preživačima, rizika od razvoja graviditetne toksemije tijekom kasne gestacije i čestog pojavljivanja većeg broja plodova, a time i otežanog jarenja i brige o mladunčadi. Iako je uobičajen u velikih farmskih vrsta domaćih životinja, transrektalni ultrazvučni pregled izazovniji je u malih preživača, kao što su koze i ovce, zbog objektivnih anatomskih razlika u veličini organizma te potrebe za držanjem životinje u ležećem položaju. Zbog toga u ovaca i koza transabdominalni pristup ima prednost u dijagnosticiranju gravidnosti. Rutinski izvodi od 30 dana od parenja pa na dalje, dok je najbolji vremenski period u razbodlju od 45 do 85 dana po parenju (VIÑOLES i sur., 2009.). Primjena ultrazvuka tijekom optimalnog vremenskog okvira kod ovce ili koze može poboljšati upravljanje gestacijom kod ovih ženki, a time i zdravlje potomstva. Detekcija graviditeta tijekom prvih 40 dana gestacije omogućuje brojanje plodova te poboljšava odluke o ponovnom parenju i/ili izlučivanju (PADILLA-RIVAS i sur., 2005.). Dijagnostika tijekom srednje i kasne gestacije omogućuje praćenje rasta ploda, identificirajući abnormalnosti u rastu prije poroda. Nadalje, gestacijska dob mladunčadi može se odrediti na temelju mjera određenih parametara ploda i posteljice dobivenih ultrazvukom, što omogućuje procjenu datuma poroda i poboljšava upravljanje u kasnoj gestaciji čak i kada datumi parenja ženki nisu poznati. Točnost brojanja plodova i dijagnoze graviditeta smanjuje se s povećanjem broja fetusa, ali se točnost može poboljšati iskustvom (FRIDLUND i sur., 2013.; JONES i sur., 2016.). Svi ti čimbenici pridonose ispravnim odlukama o upravljanju gestacijom kako bi se konačno poboljšalo zdravlje životinja i smanjili ulazni troškovi za proizvođača (JONES i REED, 2017.).

2.4.2. Intrauterini rast jaradi i fetometrija

Podaci o intrauterinom rastu jaradi su vrlo oskudni. LYGSET (1971.), u istraživanju rađenom na ovarijohisterektomiranim kozama u različitim fazama gravidnosti, navodi da se amnion povećava sa 3,5 ml na trideseti dan graviditeta na 1000 ml po plodu tijekom poroda. Dužina ploda iznosi otprilike 1,4 cm 30. dan graviditeta, a 43 cm na 143. dan. Dlačni folikuli mogu se uočiti oko 60. dana, a otvaranje očiju između 130. i 140. dana. Prosječna porođajna dužina jaradi iznosi 42,06 cm, a porođajna težina

2,81 kg. Porast porođajne dužine i težine prati starost majke. Većina provedenih istraživanja intrauterninog razvoja ploda usmjerena su na određivanje vremena jaranja s obzirom na veličinu ploda. HAIBEL (1988.), koristeći transabdominalnu ultrazvučnu sondu na 219 plodova zaključuje da se biparijetalni promjer može precizno izmjeriti oko 40. dana (otprilike pet mm) graviditeta, a da ga je iza 105. dana (42 mm) odnosno u trećem tromjesečju teže izmjeriti radi različite pozicije ploda, te da je rast ploda linearan. SUGUNA, (2008.), tjednim ultrazvučnim pregledom šest gravidnih koza zaključuje da se zametni mjehurić može detektirati između 21. i 28. dana graviditeta, a od 28. dana se može vidjeti zametak transrektalnim ultrazvučnim pregledom, kao i izmjeriti otkucaji srca ploda. Transabdominalnim ultrazvučnim pregledom, srčana akcija vidljiva je oko 35. dana graviditeta, između 35. i 45. dana moguće je utvrditi blizanački graviditet. Takozvani „C“ oblik placentoma, prosječne veličine 0,97 cm, moguće je vidjeti 42. dana graviditeta transrektalnom sondom, dok se transabdominalnom sondom placentomi mogu izmjeriti 50. dana, prosječne veličine jedan cm. Tijekom ranog graviditeta, cijeli fetus se može vidjeti na ultrazvučnom zaslonu, što olakšava mjerenje cijelog tijela, kao što je dužina od tjemena do trtice (engl. crown-to-rump lenght - CRL). Kod koza, vizualizacija cijelog ploda postaje progresivno teža nakon 40. dana graviditeta, te se stoga češće izvode mjerenja specifičnih fetalnih organa ili tkiva (ERDOGAN, 2012.). Biparijetalni promjer (BPD) simetrično je mjerenje lubanje koje se može mjeriti već od 30. dana kod koza (HAIBEL I PERKINS, 1989.; HAIBEL i sur., 1989.; KAREN i sur., 2009.). Osim toga, BPD se povećavao od 52. do 108. dana gestacije, a neovisno o prehranbenom statusu majke (LEKATZ i sur., 2013.). Koštane strukture poput lubanje, rebara i kralježnice moguće je vidjeti od 56. dana gravidnosti nadalje. Fetalni međurebreni prostor (engl. Rib space - RS) definiran je kao ukupna širina koja obuhvaća tri uzastopna rebra i njihov susjedni kaudalni međurebrni prostor, a mjera promjer trupa (engl. trunk diameter - TD) definirano je kao maksimalni abdominalni promjer u transverzalnom ili sagitalnom prikazu, mjerenje se radi tijekom druge trećine graviditeta (BERNIER GOSSELIN i sur., 2018.).

2.5. POSTPOROĐAJNO RAZDOBLJE

2.5.1. Broj ojarane jaradi

Koze češće jare blizance ili trojke nego jedno jare, no to ovisi o pasmini. Broj ojarane jaradi ovisi o broju ovuliranih jajnih stanica, koji se djelomočno razlikuje među pasminama, i uglavnom je veći u početku nego na kraju sezone. Nadalje, čimbenici koji utječu na broj ovuliranih jajnih stanica su osim genotipa, veličina, težina i kondicija životinje (GREYLING, 2010.). Na njega se može utjecati hormonalnim i nehormonalnim metodama. One poboljšavaju plodnost, dok je jednako važna ciljana hranidba. Naime, fokusirana hranidba ima pozitivan utjecaj na više čimbenika vezanih za plodnost i mužjaka i ženki, no vezano za broj jaradi, izdvaja se pozitivan utjecaj hranidbe na povećanje broja jaradi u leglu putem povećanja broja ovuliranih jajnih stanica, izbjegavanje embrionalne smrtnosti, programiranje buduće produktivnosti fetusa te povećanje postanatalnog preživljavanja i razvoja (MARTIN i sur., 2004.). Broj ojarane jaradi je u direktnoj vezi s brojem ovuliranih folikula, koji je u pravilu visok, naročito za jednike koje su u dobroj kondiciji. Na skali od jedan do pet, najboljom kondicijom za rasplod se smatra ocjena tri (SÁNCHEZ-DÁVILA i sur., 2014.). Loš(ij)a kondicija (2), osim na broj ojarane jaradi, negativno utječe i na trajanje reproduktivne sezone i na pojavu nepravilnih estrusnih ciklusa (REKIK i sur., 2014.). Suplementacija podiže postotak ovulacije u koza sa lošom tjelenom kondicijom (SÁNCHEZ-DÁVILA i sur., 2017.). Poznato je korištenje tzv. „flushing metode“, gdje se kozama prije početka i za vrijeme sezone parenja daje ili energetski ili bjelančevinama bogatija hrana, kako bi se pozitivno utjecalo na postotak ovulacije i posljedičnu prolićnost (SÁNCHEZ-DÁVILA i sur., 2014.). Moguće je i obogaćivanje hranidbe prvih 10-15 dana po parenju, kako bi se poboljšala uspješnost implantacije embrija i posljedično smanjila embrionalna smrtnost. S druge strane, pojačana hranidba neposredno nakon oplodnje može imati i negativan utjecaj na rani razvoj embrija, te se ove metode mogu koristiti samo kratkotrajno u točno određenom razdoblju reproduktivnog procesa (MARTIN i sur., 2004.). Istraživanja su pokazala da na takvo obogaćivanje hranidbe bolje odgovaraju koze čija je tjelesna kondicija dva, a ne veća. Naime, ocjenjivanje i praćenje tjelesne kondicije je dobar i jednostavan način za praćenje uskladištenih rezervi tjelesne masti posebno u razdobljima

koja su energetska zahtjeva, kod neuhranjenih jedinki ili u stresnim razdobljima. Loš utjecaj na plodnost ima i predobra tjelesna kondicija (tri ili više), jer povećava rizik za smanjenu mliječnost, zdravstvene i reproduktivne probleme, poput teških poroda, masne jetre i slično.

Poznato je da nedostatna hranidba majke ima i utjecaj na razvoj ploda, koji se ponekad očituje tek kasnije za vrijeme plodova postnatalnog života, čak i nakon spolne zrelosti, tzv. fetalno programiranje. MARTIN i sur., (2004.) su sumarno popisali na što sve utječe nedostatna hranidba majki tijekom graviditeta, napose od 60. do 120. dana gravidnosti, uključujući i posljedice na nedostatnu kvalitetu mesa (MCCOARD i sur., 2017.; GREENWOOD i sur., 2000.), sporiji razvoj jajnih stanica u fetusa ženskog spola (BORWICK i sur., 1997.; RAE i sur., 2001.), te smanjenje cjeloživotne reproduktivne sposobnosti u ovaca (RHIND i sur., 1998.). Upitna je dugoročnost učinka na prenatalne jajnike, jer ako on postoji, onda ostaje mogućnost ograničavanja stope ovulacije (MARTIN i sur., 2004.). Paradoksalno, slabija ishrana majki, prema HALES i BARKER, (1992.), omogućava fetusima bolju pripremu i metaboličko preživljavanje postnatalno u uvjetima smanjene ishrane.

Treba uzeti u obzir da povećanje potencijala za porod većeg broja potomstva mora biti praćeno i poboljšanjem zoohigijenskih mjera i uvjeta koji će osigurati preživljavanje povećanog broja mladunčadi (MARTIN i sur., 2004.). Za koze angora pasmine, koje se drže u sustavima za jedno jarenje godišnje, dva jareta po kozi se smatraju praktičnom gornjom granicom za odgajanje (SHELTON, 1978.).

Kod koza se očekuje gotovo 100% uspjeh koncepcije (ROBERTSON i sur., 2020.; DISKIN i MORRIS, 2008.), no uspjeh ovisi o sezoni, hranidbi, dobi i pasmini koza. Parenje van sezone rezultira suboptimalnim postotkom koncepcije (RESTALL, 1992.; NORTON, 2004.).

2.5.2. Laktacija u koza

Laktacija u mliječnim koza najčešće traje 305 dana, sa periodom suhostaja od 60 dana. Kozje mlijeko je poznato po svom blagom učinku u prehrani ljudi i djece intolerantnih na kravlje mlijeko (JANDAL, 1996.), zbog lakše probavljivosti,

zahvaljujući manjim masnim globulama i većem udjelu kratkolančanih masnih kiselina, ali i zbog zdravstvenih benefita, napose respiratornih bolesti kod djece (MALANICHEVA i sur., 2023.). Opisan je i *in vitro* neutralizacijski učinak kozjeg mlijeka na nekoliko virusa, između ostalog i herpes virus 1 (RUBIN i sur., 2021.). Kozje mlijeko se sastoji od 87 % vode, 3,5 % bjelancevina, 4 % masti, 4,5 % ugljikohidrata i 1 % pepela (HAENLEIN, 2001.). U uobičajenih europskih pasmina, postotak mliječne masti je oko 3,8 %, a bjelancevina oko 2,8 % (PLUMMER i sur., 2021.).

Čimbenici koji utječu na trajanje laktacije i mliječnost su svakako i reproduktivnog karaktera, napose paritet i broj mladunčadi, dok veliku ulogu ima i genetika, pasmina te hranidba (PLUMMER i sur., 2021.). Utjecaj broja mladunčadi i pariteta na mliječnost, prema MARGHATO i sur., (2019.) je donekle konverzan između mesnih i mliječnih pasmina, a na njega utječe i reproduktivni management (MORANTES i sur., 2012.). Naime, stadima u kojima se koriste programi asistiranje reprodukcije prolićnost je veća, a veća prolićnost veže se za veću mliječnost, unatoč duljem trajanju laktacije u koza sa dva u odnosu na jedno jare (THOMAS i sur., 1977.; HAYDEN i sur., 1979.; BROWNING i sur., 1995.; CARNICELLA i sur. 2008.). Uz broj jaradi, i sam paritet pozitivno utječe na duljinu laktacije a time i ukupnu mliječnost, napose od četvrte laktacije nadalje (CARNICELLA i sur., 2008.).

Nedovoljno je istražen i učinak određenih reproduktivnih problema na mliječnost u koza, napose pojava pobačaja i mrtvorodne jaradi, no određeni autori primjećuju njihov negativan učinak na standardiziranu mliječnost u 150 dana (SIMÕES i PIRES, 2018.).

Broj somatskih stanica u mlijeku kod malih preživaca je vezan uz paritet, trajanje laktacije, stres, ali i pojavu estrusa, te nastup infekcije. Dodatan problem jest i apokrini tip sekrecije, koji rezultira otpuštanjem veće količine staničnog debrisa, pa koze u odnosu čak na ovce proizvode i do 10 puta više citoplazmatskih kaplica, što komplicira metode određivanja broja somatskih stanica i njihovo tumačenje u smislu kontrole pojave infekcija mliječne žlijezde. Najveći dio somatskih stanica u koze čine neutrofili, čak do 74-80 % u kasnoj laktaciji, (BERGONIER i sur., 2003.), neovisno o statusu infekcije vimena.

2.5.3. Odbiće i preživljavanje jaradi

Uzgoj jaradi usko je vezan s uzgojem mliječnih pasmina koza jer izuzev obavezne gestacije za ulazak u laktaciju, podjednako bitnu osnovu uspješnog uzgoja čini unos novih jedinki u stado i unaprjeđenje genetike stada. Obzirom na sezonalnost spolnog ciklusa koza, uzgajivači imaju relativno kratak vremenski okvir unutar kojeg je većina uzgojnih aktivnosti povezana s jarenjem i njihovim podizanjem. Ženska jarad se u većini uzgoja ostavlja unutar istog uzgoja te čini zamjenu životinja u produkciji, dok se muška jarad prodaje, uzgaja za tov ili u slučaju izvrsne genetike ostavlja za rasplod. Optimalno othranjivanje i podizanje podmlatka dovodi do visoko produktivnih i otpornih mliječnih koza, te umanjuje gubitke čime se povećava zarada. S ciljem smanjivanja mortaliteta, ne postoji protokol uzgoja koji bi odgovarao svim farmama, već postoje smjernice kojima se svaka farma individualno prilagođava. Da bi se utvrdili mogući problemi u uzgoju uzgajivači su dužni voditi evidenciju o svim gubitcima. Malen broj provedenih istraživanja pokazuje da se mortalitet u jaradi kreće između 7 i 32% (DIJKSTRA i sur., 2023.). Rezultati istraživanja provedenog između 2016 i 2020 dokazuju da se 43% uginuća jaradi događa unutar prvih četiri tjedna života, s većim udjelom unutar neonatalnog razdoblja (ROBERTSON i sur., 2020.; TODD i sur., 2019.). Ukoliko je visok neonatalni mortalitet potrebno je učiniti provjeru menadžmenta gravidnih koza, provjere mjera sanitacije i uvođenje preventivnih zdravstvenih mjera koje uključuju unaprjeđenje higijenskih mjera, dezinfekciju pupkovine i unos kolostruma (DWYER i sur., 2015.). U postnatalnom razdoblju očekuje se značajno niži mortalitet. TODD i sur., (2019.), navode da su gastrointestinalni poremećaji, upale pluća i odgođavanje vodeći uzroci uginuća pri uzgojima na Novom Zelandu, dok godišnje izvješće o praćenju i nadzoru zdravlja malih preživača u Nizozemskoj (ANONYMOUS, 2022.). ističe da najviše štete uzrokuju bolesti koje zahvaćaju respiratorni ili gastrointestinalni sustav te bolesti koje zahvaćaju zglobove. Razdoblje odbića uzrokuje pojavu stresa, a posljedično tome i povećana oboljenja unutar stada (AUFY i sur., 2016.; MAGISTRELLI i sur., 2007.). Optimalno odbiće nužno je za pravilan razvoj crijevne flore i uspješne apsorpcije hranjivih tvari iz krute hrane, inače je ugrožen rast i razvitak same jedinke. U Nizozemskoj, odbiće jaradi vrši se uglavnom u dobi od šestog do sedmog tjedna starosti. U pojedinim uzgojima zbog pojave artitis-encefalitis virusa, za kojeg je dokazano širenje

putem kolostruma, jarad niti nema doticaj s majkom, već se hrani putem mliječne zamjene odmah po rođenju. NALBERT i sur., (2019.), dokazuju da ovakav sustav ranog odbića odnosno nepostojanja doticaja majke i jaradi nema negativnog utjecaja na razvoj jaradi. Mortalitet jaradi u dobi do šest mjeseci u intenzivnom mliječnom uzgoju koza iznosio je između 0-38,3% (SANTMAN-BERENDS i VELLEMA, 2017.).

2.6. POKAZATELJI REPRODUKTIVNE USPJEŠNOSTI

2.6.1. Dob i veličina majke

Dokazana je povezanost dobi plotkinje i porođajne mase ploda, mladunčad rođena od mlađih plotkinja je manje porođajne mase, što može imati negativne posljedice na postpartalno razdoblje jaradi zbog smanjene otpornosti (GORDON, 1997.; KENYON i BLAIR, 2014.). Nadalje, prerano uvođenje šilježica u rasplod može dovesti do pobačaja i mrtvorodenja. Više je mogućih razloga zbog koji šilježice pobace tijekom prvoga graviditeta. Jedan od razloga loše plodnosti šilježica je ne dovoljno razvijen imunološki sustav, što ih čini prijemljivijima na zarazne bolesti koje uzrokuju pobačaje (kampilobakterioza i toksoplazmoza). Perinatalna uginuća jaradi su češća u mladunčadi čije su majke mlade i neiskusne, najčešće prvorotkinje (CONSTABLE i sur., 2017.; DWAYER i sur., 2015.; NOWAK i sur., 2000.). Iako kasnije pripuštanje zapravo smanjuje ukupni reproduktivni potencijal, odgađanje uvođenja u reprodukciju ima pozitivne posljedice, u smislu čekanja do potpunog razvoja majke, povećanja postotka koncepcije, učestalosti multiplih poroda te osiguravanja opstanka mladunčadi (GREYLING, 2010.). Međutim, i kod starijih plotkinja može doći do pobačaja, rađanja mrtve ili avitalne jaradi, napose u jedinki strijih od sedam godina koje su do tada redovito porađale (FERNANDEZ, 2014a.). Prema MELLADO (2016.), više od 70 % stada bi trebale sačinjavati koze u dobi od tri do šest godina, a sve one koje iz različitih razloga ne koncipiraju tokom sezone (problemi sa spolnim sustavom, koze slabije kondicije, koze sa problemima u održavanju tjelesne kondicije za vrijeme gravidnosi, koza sa sklonošću pobačajima) bi trebalo izlučiti iz stada.

2.6.2. Embrionalna i fetalna smrtnost

U koza embrionalna smrtnost može predstavljati problem, malo manje nego kod ovaca, no uobičajeni postotci kreću se od 18 % za embrionalna uginuća kod duplih, te 40 % kod trostrukih i više ovulacija (DISKIN i MORRIS, 2008). Najčešće je gubitak gravidnosti posljedica nedostatne hranidbe, osobito u kasnijim fazama gravidnosti, te iznosi 53 % (URRUTIA-MORALES i sur., 2012.), odnosno 70% (MELLADO i sur., 2004.). Također, loša ocjena tjelesne kondicije za vrijeme parenja podiže gubitke na 20% kod koza čija je ocjena tjelesne kondicije dva, u odnosu na do 7% fetalnih uginuća u koza tjelesnu kondiciju tri u trenutku parenja (MELLADO i sur., 2004.).

2.6.3. Pobačaji

Koze su životinje koje su ovisne o žutom tijelu za održavanje gravidnosti. Stoga svaki čimbenik koji ugrožava opstanak žutog tijela predstavlja potencijalnu opasnost za prekid gravidnosti (HEATH i sur., 2007.). Uzročnici pobačaja se dijele na zarazne i nezarazne, a kod nezaraznih okolišni su često oni na koje se može utjecati (ili čiji se učinak može smanjiti) dobrim zoohigijenskim mjerama. To su prvenstveno ekstremne vremenske neprilike (temperatura, padaline, vjetar), ingestija toksičnih biljki, predatori te drugi uzroci stresa. Većina pobačaja koji nastupaju zbog stresa se događa između 90 do 110 dana gravidnosti (SHELTON, 1978.). Kod nezaraznih pobačaja ostale etiologije, uzrok je često nepoznat i uglavnom je riječ o toksičnom učinku na plod ili o deficijenciji tvari neophodnih za pravilan rast ploda (EDMONDSON i SHIPLEY, 2021.). Neodgovarajuća hranidba može uzrokovati pobačaje s incidencijom i preko 50 % (MELLADO, 2016.). Pobačaji zarazne etiologije se, obzirom na uzročnika mogu podijeliti na bakterijske, virusne, protozoalne i mikoplazmatske (EDMONDSON i SHIPLEY, 2021.). Od bakterijskih najučestaliji uzročnici su *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydophila spp.*, *Francisella tularensis*, *Leptospira spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Salmonella spp.*; od virusne etiologije po važnosti se izdvajaju su: kozji herpesvirus 1, bolest plavog jezika, BVDV (engl. Bovine viral diarrhea virus, virus proljeva goveda), virus doline Cache (WADDEL i sur., 2019.), virus Riftske doline (LEBRETON i sur., 2006.), Akabane virus (GAO i sur., 2022.), i Nairobi virus (KRASTEVA i sur., 2020.). *Coxiella burnetii* je uzročnik Q-groznice koja uzrokuje

pobačaj u malih preživača, a toksoplazmoza, sarkocistoza i neosporoza su protozalne infekcije koje će dovesti do pobačaja u ovaca i koza (CHASE i sur., 2017b.). U usporedbi s drugim farmskim životinjama, koze, kao i ovce, imaju učestaliju pojavnost pobačaja, te se učestalost do 5 % godišnje smatra uobičajenom, manje od 5 % dobrom, a manje od 2 % izvrsnim rezultatom (GIVENS i MARLEY, 2008.; TEMPESTA i sur., 2004.; MENZIES i MILLER, 2007.).

2.6.4. Porođajna masa, perinatalna uginuća i broj odbijene jaradi

Porođajna masa važna je karakteristika rasta kod koza, koja ima izuzetan produktivni i ekonomski značaj za učinkovitu proizvodnju. Veličina pri rođenju kod koza i ovaca prati uzorak prenatalnog rasta i razvoja, koji određuju genetika i razni okolišni čimbenici. Tjelesna masa pri rođenju znatno utječe na masu pri odbiću janjadi/jaradi. Osim utjecaja pasmine, okolišni čimbenici koji utječu na masu pri rođenju uključuju prehranu, dob i paritet majke, sezonu i godinu, spol i tip rođenja. Mužjaci imaju veću porođajnu masu u usporedbi sa ženkama, što se može održati sve do dobi odbijanja. Sezona jarenja znatno utječe na porođajnu masu zbog utjecaja na dostupnost pašne. Prvorotkinje rađaju i manji broj plodova ali i plodove sa manjom porođajnom masom, pri čemu je masa kod jarića rođenih kao trojke niža u usporedbi s onima rođenima kao blizanci, što je pak niže nego kod jarića rođenih pojedinačno (ASSAN 2020).

Iako se preferira jarad sa većom tjelesnom masom, ona može imati negativne posljedice jer predisponira za distociju, ukoliko je mladunče preveliko za porođajni kanal. S druge strane, jarad manje tjelesne mase u postpartalnom razdoblju ima manje izgleda za preživljavanje zbog smanjene rezerve masnoga tkiva i nemogućnost dostatne termoregulacije (FERNANDEZ, D., 2014b.). Porođajnu masu određuju hranidba, genetska obilježja roditelja, te veličina legla. Veličina legla je također određena genetskim svojstvima same roditelja. Istraživanja pokazuju izravnu vezu porođajne mase jaradi s kondicijom i hranidbom roditelja u zadnjoj trećini graviditeta, ali i sa perinatalnim uginućima (MCCOARD i sur., 2017.). Mala porođajna masa je tako jedan od značajnijih razloga za uginuća u perinatalnom razdoblju. Osim porođajne mase, značajni su se pokazali i broj mladunčadi u leglu, spol mladunčeta te njegovo ponašanje (CONSTABLE i sur., 2017.; DWAYER i sur., 2015.). Veću vjerojatnost za preživljavanje ima jarad

porođena s tri kg ili više. Jarad veće porođajne mase imaju dovoljno energije za održavanje tjelesne topline te će se lakše ustati da bi krenuli sisati. Jarad manje porođajne mase sklonija su izgladnjivanju i hipotermiji. Nadalje, jarad s lakšom porođajnom masom, i oni koji su bili lakši u 25. danu života imali su, prema MELLADO i sur., (2016.), 20% manju šansu da koncipiraju kao odrasle jednike, što ukazuje na dugoročan genetski učinak hranidbe. U višebrojnim leglima manja je mogućnost za preživljavanje jaradi obzirom da su manje porođajne mase, s manje smeđega masnog tkiva, a raspodjela kolostruma je neravnomjerna. Stoga je u višebrojnim leglima prvih mjesec dana kritično razdoblje (FERNANDEZ, 2014a., FERNANDEZ, 2014b., MANIRAKIZA i sur., 2020.). Perinatalne bolesti mogu uzrokovati velike gubitke u kozarstvu. Procjenjuje se da 10-30% mladunčadi malih preživača uginu prije odbića, a gotovo se polovica tih uginuća događa se na dan poroda. Ipak, udio uginuća ovisi o načinu vođenja farme i načinu držanja stada, te na dobro vođenim farmama na taj dio otpada tek 5-10% svih perinatalnih uginuća (CONSTABLE i sur., 2017.). Osim kasnih pobačaja te mrvtorođena uzrokovanih distocijom, uzroci perinatalnih uginuća su i zarazne bolesti, te drugi relativno manji uzroci kao što su: kongenitalne malformacije, grabežljivci i nezgode (DWAYER i sur., 2015.).

Obzirom na skrb koju jarad ima u intenzivnim uzgojima, broj uginuća od poroda do odbića je relativno mali, te je realno očekivati da 90% jaradi bude odbijeno od majke (MELLADO, 2016.). Viši postotak uginuća je očekivan u brojnijim leglima, pa tako legla s jednim jaretom imaju mortalitet do 17%, blizanci do 13 do 18%, a trojci i više od 18 do 83% (ROBERTSON, 2020.; LEHLOENYA i sur., 2005.; SNYMAN, 2010.; ALDRIDGE i sur., 2015.; NOGUEIRA i sur., 2015.). Većina uginuća su ipak vezana za rani perinatalni period, unutar par dana po porodu, iako su zbog bolesti moguća i kasnije uginuća. Najčešći uzroci su ili distocija ili izgladnjivanje posljedično lošoj vezi s majkom (ROBERSON i sur., 2020.).

2.7. KOZJI HERPESVIRUSI

2.7.1. Povijest

Kozji herpesvirus 1 (CpHV-1) otkriven je 1974. godine (SAITO i sur., 1974), a kozji herpesvirus 2 (CpHV-2) i kozji limfotropni herpesvirus 2001. godine (CHMIELEWICZ i sur., 2001.; LI i sur., 2001.). Za CpHV-1 je poznato da većinom uzrokuje većinom subkliničke infekcije, osobito u odraslih jedinki, međutim dokazani su slučajevi gdje je uzrokovao pobačaje, vulvovaginitis, balanopostitis, a u mladim jedinkama respiratorne poremetnje, vrućicu i leukopeniju (GREVAL i WELLS, 1986.; TEMPESTA i sur., 1999b.; PIPER i sur., 2008;). Zbog uske srodnosti CpHV-1 provedene su pokusne križne infekcije s BHV-1 kod koza i CpHV-1 kod teladi. Koze zaražene BHV-1 razvile su blage znakove bolesti tijekom akutne infekcije, dok je infekcija CpHV-1 kod teladi imala subklinički tijek. Međutim, izlučivanje virusa i stvaranje antitijela bili su indikativni za uspješnu križnu infekciju i BHV-1 i CpHV-1, te zbog toga mogu biti potencijalni BHV-1 rezervoar (SIX i sur., 2001.).

Koze se smatraju rezervoarima CpHV-2, OvHV-2 i CaLHV, a CpHV-2 i OvHV-2 često mogu zaraziti jedinku u isto vrijeme, dok se ovce smatraju rezervoarima virusa OvHV-2 (LI i sur., 2001.). Kod drugih osjetljivih vrsta preživača CpHV-2 i OvHV-2 mogu uzrokovati MKG. Zajedno s CpHV-2, CpLHV se smatra enzootskim gamaherpesvirusom u stadima koza (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). Prethodna saznanja o ovim virusima proizašla su iz praćenja maligne kataralne groznice. U prvoj trećini 20. stoljeća započela su prva istraživanja vezana uz MKG (METTAM, 1923.; DAUBNEY i HUDSON, 1936.). Uzročnik MKG kod ovaca, odnosno OvHV-2, nije se mogao uzgojiti na kulturama stanica, pa su opsežnija istraživanja ove vrste bila moguća tek otkrićem molekularnih metoda dokazivanja deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i dokazivanja protutijela kroz razvoj seroloških metoda. Ovčji herpesvirus 2 postoji kao sveprisutna infekcija domaćih ovaca (*Ovis aries*) koja je zbog kozmopolitske rasprostranjenosti ovaca odgovorna za većinu slučajeva MKG u svijetu. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) u razdoblju od 1990. do 1995. godine ispitivana je seroprevalencija MKG uzrokovane OvHV-2 u preživača pomoću kompetitivnog inhibicijskog imunoenzimnog testa (engl. Competitive

Inhibition-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - CIELISA). U goveda za koja se nije znalo jesu li bila u kontaktu s ovcama, prevalencija protutijela za alcelaphine herpesvirus 1 koji uzrokuje MKG bila je 4% (10/238). Kod goveda koja su bila u kontaktu s ovcama, protutijela su otkrivena u 13% (21/157) životinja. Koze su imale seroprevalenciju od čak 61% (177/291). Ovce iz populacija za koje se nije znalo da su povezane sa slučajevima MKG imale su seroprevalenciju od 53% (282/531), dok su ovce iz populacija sa slučajevima MKG imale seroprevalenciju od 59% (88/149). Značajna razlika u prevalenciji je bila između grupe goveda koja nije imala povijest kontakta s ovcama i grupe goveda koja je imala povijest kontakta s ovcama. Nije bilo značajne razlike u prevalenciji između grupe ovaca povezanih sa slučajevima MKG-a i druge grupe (LI i sur., 1996.). U idućem većem istraživanju u SAD-u su uspoređeni umnoženi nukleotidni slijedovi OvHV-2 pronađeni kod četiri ovce, dva goveda, dva bizona, jednog jelena, i jednog losa koji su bili oboljeli od kliničkog oblika MKG-a. Životinje su bile s različitih zemljopisnih lokacija (Arizona, Colorado, Idaho, Montana i Washington, Alberta u Kanadi). Sličnost nukleotidnih slijedova OvHV-2 virusa pronađenih kod ispitivanih životinja s OvHV-2 nukleotidnim slijedovima gena DNK polimeraze iz banke gena (GenBank) je bila 98-100%. Ovo istraživanje je potvrdilo OvHV-2 glavnim uzročnikom izbijanja MKG-a u Sjevernoj Americi (LI i sur., 2001.).

Najnovije praćenje prevalencije OvHV-2 je provedeno u Pakistanu 2021. godine. Nasumično su odabrana zdrava goveda i bivoli, uz koje su kao mogući rezervoari pretražene i koze i ovce, također nasumičnim odabirom. Na OvHV-2 PCR pretragom bilo je pozitivno: 9% goveda, 6,5% bivola, 11% koza i 13% ovaca (AAYESHA i sur., 2021.). Daljnim istraživanjem uz alcelaphine herpesvirus 1 (AlHV-1) i ovčji herpesvirus 2 otkriven je i treći virus kao mogući uzročnik MKG-a, CpHV-2 (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). DNK ovog virusa je dokazan kod bjelorepih jelena koji su razvili kliničku sliku MKG-a, ali prirodni rezervoar virusa tada nije još bio otkriven (LI i sur., 2001.). Na Veterinarskom fakultetu u Berlinu prikupljeni su uzorci krvi šest krava, šest ovaca i šest koza koje su držane zajedno s inficiranom svinjom. Ugnježđenom lančanom reakcijom polimeraze (engl. nested polymerase chain reaction, nested PCR) je dokazan ispitivani virus kod četiri od šest koza. Dodatno je uzorkovano šest koza iz Berlinskog zoološkog vrta te su dvije od šest koza bile pozitivne. Dokazan je novi kozji gamaherpesvirus koji

je limfotropan te ima visok postotak genetske sličnosti s ovčjim herpesvirusom 2 (>83%), s alcelaphine herpesvirusom 1 (>76%) i goveđim limfotropnim herpesvirusom (>61%). Novootkriveni kozji herpesvirus, ujedno i prvi gamaherpesvirus otkriven kod koza, nazvan je CpHV-2 (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). Još jednim istraživanjem je potvrđen CpHV-2 u stadu koza, i to kod 24 od 27 ispitivanih uzoraka (LI i sur., 2001.).

U prethodno spomenutom istraživanju u SAD-u je 2001. godine dokazan još jedan kozji gamaherpesvirus. Koze su nekoliko godina držane zajedno s ovcima na istom staništu. Kod tri od 27 ispitivanih uzoraka je dokazano postojanje novog virusa. Nukleotidni slijedovi virusa su bili međusobno identični, a 91% genetski slični s goveđim limfotropnim herpesvirusom (engl. Bovine lymphotropic herpesvirus - BLHV). Zbog sličnosti s nukleotidnim slijedovima BLHV, ovaj kozji gamaherpesvirus je nazvan kozjim limfotropnim herpesvirusom (CpLHV) (LI i sur., 2001.).

Od prosinca 2003. do lipnja 2005. godine u četiri provincije Turske uzorkovano je 200 ovaca, koza i goveda. OvHV-2 je potvrđen PCR testom u uzorcima koza i ovaca. Prethodno je seroprevalencija protutijela za uzročnike MKG kod ovaca utvrđena u 97,5%, te koza na 96%, a kod krava na 15% korištenjem komplementarnog imunoenzimnog testa (engl. complement-enzyme linked immuno sorbent assay cELISA). Ovim istraživanjem ustanovljeno je da su infekcije gamaherpesvirusima, koji se smatraju uzročnicima MKG-a, česte u sjeverozapadnoj Turskoj. Također, utvrđeno je da ovce i koze imaju gotovo jednaku ulogu u epizootologiji MKG-a u Turskoj. (YEŞILBAĞ, 2007.). Zadnji podaci o seroprevalenciji CpHV-1 u koza (123/838 tj. 14,68% bilo je seropozitivno) provedeni su u Meksiku (GARCIA-HERNANDEZ i sur., 2019.). Posljednja istraživanja vezana uz CpHV-1 usredotočena su na citopatogeni učinak na humanim tumoroznim staničnim kulturama (PC3, MDA-MB-468, U2OS i HeLa stanične linije) (MONTAGNARO i sur. 2019.) i uzrokovanje apoptoze te sinergističkog djelovanja cisplatinom u stanicama malignog mezotelioma (FORTE i sur., 2021.), čime pružaju optimistična očekivanja u onkolitičkoj viroterapiji.

2.7.2. Građa herpesvirusa

U početku istraživanja herpesvirusa proučavana je građa viriona, te je 1950-ih godina elektronskom mikroskopijom prvi put pokazana njegova kompleksna struktura (MCGEOCH i sur., 2006.). Herpesvirusi su parazitarni mikroorganizmi jednostavna ustroja, koji imaju dva osnovna dijela: jezgru i proteinski ovoj. Jezgru čini razmjerno velika dvostruka uzvojnica DNK koja kodira 120 do 200 gena. Antigenski proteinski ovoj (nukleokapsida) čine virusne bjelančevine i glasničke ribonukleinske kiseline (RNK). Kapsida je ikozaedarske simetrije, a oblikuju je 12 pentamernih i 150 heksamernih podjedinica (kapsomere). Tvorba je okružena zaštitnim slojem amorfnih bjelančevina (tegument), a izvana je oblaže dvoslojna lipoproteinska ovojnica s trnastim glikoproteinskim izdancima na površini. Cjelovita virusna čestica je veličine 100 do 200 nm (CARTER i sur., 2006.).

2.7.3. Genom herpesvirusa

Genomsku DNK herpesvirusa čini jedna linearna dvolančana molekula DNK s nesparenim nukleotidima na svakom kraju te se genomi međusobno veoma razlikuju po svojoj veličini, organizaciji i sastavu baza. Veličina genoma varira od 124 kilo parova baza (kpb) (Simian varicella virus iz podporodice *Alphaherpesvirinae*) do 241 kpb (Chimpanzee cytomegalovirus iz podporodice *Betaherpesvirinae*) (MCGEOCH i sur., 2006.; MCGEOCH i sur., 2008.). Veći dio genoma čine jedinstveni nukleotidni slijedovi, ali sadržava i ponavljajuće nukleotidne slijedove 10^3 - 10^4 pb (MCGEOCH i sur., 2006.; MCGEOCH i sur., 2008.). Regije koje kodiraju proteine čine većinu genoma (geni uglavnom imaju malo introna, i to ovisi o podporodici), ali postoje i velike regije koje kodiraju za RNK koje nisu uključene u translaciju nego im je zasad uloga nepoznata (smatraju se da su povezane s latencijom) (MCGEOCH i sur., 2006.). Procjenjuje se da otprilike 70-86 gena kodira proteine (čak 165 gena kod Cytomegalovirus) (MCGEOCH i sur., 2008.). Geni koji se eksprimiraju prvi su geni za proteine kasnih gena. Rani geni obuhvaćaju enzime koji su uključeni u DNK replikaciju, metabolizam nukleotida i sintezu glikoproteina ovojnice, dok kasni geni kodiraju proteine koji tvore virion (MCGEOCH i sur., 2006.).

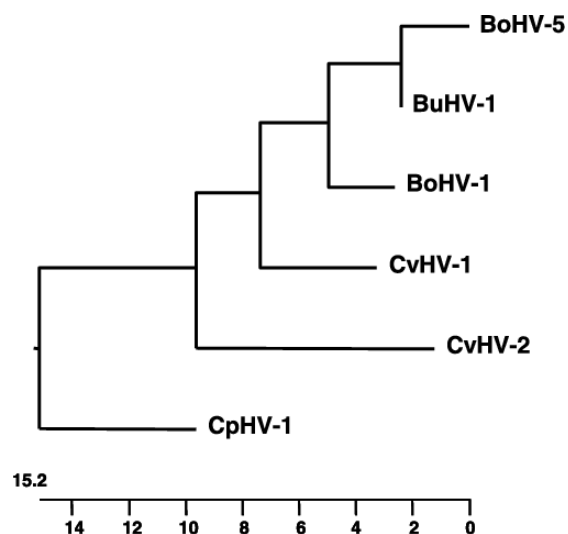
Konzervirani geni su većinom smješteni u centralnim regijama genoma i određuju herpesvire kao porodicu (WEIR, 1998.). U sve tri podporodice pronađeno je 40 takvih sržnih gena. Sržni geni većinom su grupirani u sedam grupa prema svojoj funkciji i većina je odgovorna za litičku replikaciju virusa. U prvu grupu sržnih gena zaduženih za DNK umnažanje se ubrajaju: UL30, UL42, UL9, UL5, UL8, UL52 i UL29. U drugoj grupi gena su manje važni enzimi za DNK umnažanje: UL23, UL39, UL40, UL50 i UL2. Trećoj grupi sržnih gena s ulogom obrade i pakiranja DNK pripadaju: UL12, UL15, UL28, UL6, UL25, UL32, UL33, te UL17. Za izlazak kapside iz jezgre je zadužena četvrta skupina koja broji dva gena: UL31 i UL34. U petoj skupini gena koja je zadužena za sklapanje i strukturu kapside su: UL19, UL18, UL38, UL35, UL26 i UL26.5. U sastavu tegumenta se nalaze geni šeste grupe sržnih gena, a to su: UL7, UL11, UL14, UL16, UL36, UL37 i UL51. Sedma skupina gena se nalazi u sastavu membrane, a u nju se ubrajaju: UL27 (Glikoprotein B), UL1, UL22, UL10, te UL49A. Dodatno za kontrolu i modulaciju su zaduženi geni UL13 i UL54. Postoji još jedan sržni gen s nepoznatom funkcijom, a to je UL24. Geni za latenciju ne pripadaju u sržni set gena (MCGEOCH i sur., 2006.; MCGEOCH i sur., 2008.).

2.7.4. Taksonomija i klasifikacija

Herpesvirusi (*Herpesviridae*) su velika porodica endonuklearnih DNK virusa koji uzrokuju infekcije u ljudi i ostalih kralješnjaka te u nekih beskralješnjaka (mekušci) (ADAMS i CARSTENS, 2012.). Cijela porodica je taksonomski promaknuta u red *Herpesvirales*. Porodica herpesvirusa (*Herpesviridae*) podijeljena je u tri podporodice: alfa herpesvirusi, beta herpesvirusi, i gama herpesvirusi (DAVISON, 2010.). Filogenetsko stablo *Gammaherpesvirinae* bazirano je na nukleotidnim slijedovima glikoproteina B i DNK-polimeraze. Utvrđeno je da od 11 glavnih linija čak njih pet sadržava viruse čiji domaćini dolaze iz dva ili više udaljena taksonomska reda što ukazuje na to da se dogodio širok prijenos virusa među domaćinima (MCGEOCH i sur., 2008.). Po drugoj strani, podporodice *Alphaherpesvirinae* i *Betaherpesvirinae* pokazale su izrazitu koevoluciju sa svojim domaćinima (MCGEOCH, 2001.). Drugi pristup konstruiranja filogenetskog stabla koristi metodu koja mjeri udaljenosti i djelomično uređenje dinukleotida (usporedba 13 herpesvirusa). Ova tehnika je potvrdila klasifikaciju na tri podporodice, ali

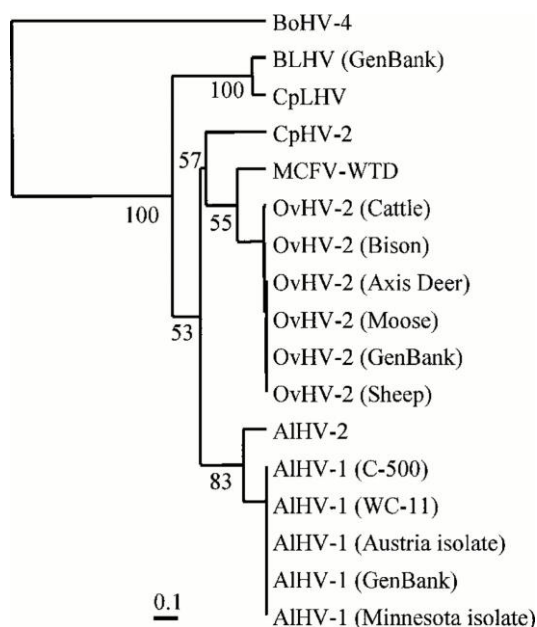
je dovela do drugačijeg saznanja o podrijetlu herpesvirusa. Ovime je pretpostavljeno da je virus sličan humanom herpesvirus 6 (HHV-6) bio predak herpesvirusa što pokazuje da se podporodica *Betaherpesvirinae* odvojila prva, a da je *Alphaherpesvirinae* najmlađa podporodica. Zanimljivo je da je ovom tehnikom pokazano da su nukleotidni slijedovi genoma Epstein Barrovog virusa (humani herpesvirus 4 - HHV-4) najbliži ljudskim nukleotidnim slijedovima te da je čak trećinu svog genoma ovaj virus preuzeo iz stanice domaćina (WEIR, 1998.; UMENE i SAKAOKA, 1999.). Ova spoznaja je važna i za proučavanje i praćenje ostalih gamaherpesvirusa, kako u ljudskom, tako i u životinjskom svijetu.

CpHV-1 pripada redu podporodici *Alphaherpesvirinae*, red *Varicellovirus* koja sadrži sedam genetski srodnih virusa. Usko je povezan s goveđim herpesvirusom 1 (BoHV-1).



Slika 1. Filogenetsko stablo izvedeno iz aminokiselinskih slijedova gB regija alphaherpesvirusa preživača (THIRY i sur., 2006a.).

Virusi koza i ovaca koji pripadaju u red *Macavirus* i podporodicu *Gammaherpesvirinae* su OvHV-2, CpHV-2 i CpLHV. Virusi koji također pripadaju ovom redu, ali inficiraju druge vrste životinja su BoHV-4, BLHV, MCFV-WTD, AlHV-1 i AlHV-2 (LI i sur., 2001.).



Slika 2. Prikaz filograma temeljen na djelomičnim aminokiselinskim sekvencama homolognog fragmenta gena za DNK polimerazu iz pet članova MKG skupine virusa i drugih limfocitima povezanih članova gamaherpesvirusa preživača (LI i sur., 2001.).

2.7.5. Tenacitet

Herpesvirusi su relativno stabilni u okolišu. U hladnim razdobljima mogu preživjeti 30 dana pri relativnoj vlažnosti zraka od 90%. U nastambama zimi prežive 6-13 dana, a u proljeće 5-9 dana. Virus je na -20 °C postojan godinu dana, a zatim mu infektivnost opada. Na 37 °C preživi desetak dana. Osjetljivi su na otapala lipida (eter, klor), kiseli pH, duboko smrzavanje i liofilizaciju (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.).

2.7.6. Proširenost

Infekcija CpHV-1 zabilježena je širom svijeta, u SAD-u, Kanadi, Novom Zelandu i u Europi. Iako je virus prvi put u Europi izoliran u Švicarskoj, novije serološke studije sugeriraju da je infekcija posebno prisutna u mediteranskim zemljama kao što su Italija, Španjolska i Grčka. U tim zemljama je zabilježena visoka seroprevalencija (između 21% u Španjolskoj i 60% u južnoj Italiji) (KOPTOPOULOS i sur., 1988.; GUERCIO i sur., 1998.; KEUSER i sur., 2004.). U Francuskoj, rezultati su pokazali visoku

seroprevalenciju u južnom dijelu Korzike, ali infekcija CpHV-1 nije identificirana u nekoliko okruga u unutrašnjosti zemlje (THIRY i sur., 2006b.; SUAVET i sur., 2016). Kozji herpesvirus 2 i kozji limfotropni herpesvirus su enzoonotski gamaherpesvirusi u stadima koza. Prvi otkriveni kozji gamaherpesvirus, CpHV-2, je prvi puta opisan u SAD-u kod bjelorepih jelena koji se razvili kliničku sliku MKG-a (LI i sur., 2001.), a na Veterinarskom fakultetu u Njemačkoj i u Berlinskom zoološkom vrtu, je opisan kod koza (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). U SAD-u je kod koza prvi put potvrđena infekcija CpLHV (LI i sur., 2001.). Zbog sveprisutne infekcije domaćih ovaca (*Ovis aries*) s OvHV-2 ovaj virus je odgovoran za većinu slučajeva MKG-a u svijetu. Praćenjem MKG-a povezanog s ovcama, potvrđeno je da se infekcija ovaca s OvHV-2 većinom javlja u Europi i Sjevernoj Americi (RUSSELL i sur., 2009.). Također je o bolesti izvještavano iz različitih dijelova Srednjeg Istoka (ABU ELZEIN i sur., 2003.), te s Novog Zelanda (RUSSELL i sur., 2009.). Ova bolest se je i ozbiljan problem kod Balijskog goveda u Indoneziji (WIYONO i sur., 1994.). U SAD-u je potvrđeno da osim ovaca, OvHV-2 inficira i koze (LI i sur., 2001.).

2.7.7. Epizootiologija

Ulazna vrata CpHV-1 u koza su sluznica nosa ili vagine. Iako nije bilo moguće odrediti koji je od putova značajniji u epizootiologiji infekcije, vaginalni put čini se važnijim jer se virus može širiti unutar stada parenjem. Nakon infekcije, CpHV-1 uspostavlja latentnu infekciju. Prilikom stresnih uvjeta, moguća je reaktivacija virusa, pri čemu CpHV-1 pokazuje slično ponašanje kao tijekom primarne infekcije: intranazalno zaražene životinje izlučuju virus i preko nosa i vagine, dok intravaginalno zaražene koze izlučuju virus samo vaginalnim putem (BUONAVOGLIA i sur., 1996.). Subklinička CpHV-1 infekcija je vrlo rasprostranjena, a koze se čine jedinim prirodnim rezervoarom virusa. (TEMPESTA i sur., 2001).

Za CpHV-2 i CpLHV još uvijek nije opisano kliničko očitovanje bolesti kod koza. Izvor infekcije je nepoznat, kao i ulazna vrata i način širenja. Pretpostavka je da su koze samo rezervoari uzročnika, a u slučaju CpHV-2 je dokazano da su rezervoar virusa za osjetljivu porodicu *Cervidae* (ZHU i sur., 2018.). Ranije studije su kod nasumično uzetih uzoraka

bez označene dobne kategorije koza i ovaca pokazale sličnu seroprevalenciju koza i ovaca u odnosu na janjad i jarad (LI i sur. 1996.).

U istraživanju CpHV-2 seroprevalencije kod koza, uzorkovano je 15 jaradi koju su ojarile inficirane koze. Jaradi je dva puta u mjesec dana uzorkovana krv, od prije prvog sisanja pa sve do dobi od 13 mjeseci. Jarad koja još nisu sisala majku nisu bila seropozitivna. Serokonverzija je nastupila nakon početka sisanja majke, očekivano nakon konzumacije kolostruma i unosa maternalnih protutijela. Titar maternalnih protutijela drastično opada u dobi od tri mjeseca. Postotak seropozitivne jaradi raste na 40% u dobi od devet mjeseci, a doseže 100% do dobi od 12 mjeseci starosti (LI i sur., 2001.). Razvoj titra protutijela kod jaradi i koza pokazao se sličnim onome kod janjadi i ovaca (LI i sur., 1998.).

Za sada nema dokaza da ovčji herpesvirus 2 uzrokuje kliničko očitovanje bolesti kod ovaca, dok u koza vrlo rijetko dovodi do MKG (MAKONI i sur., 2024.). Virus se može prenositi horizontalno s ovaca i koza na drugu osjetljivu vrstu direktnim kontaktom ili kapljično. Kod ovaca, najčešće ga prenosi janjad do 12 mjeseci starosti (MUSHI i sur., 1980.; MUSHI i RURANGIRWA, 1981.; LI i sur., 1998.). Novorođena janjad nije inficirana s OvHV-2, i nema dokaza da ovce u fazi janjenja izlučuju više virusa. U jednoj studiji je dokazano da je 93% ispitivane janjadi, čije su majke bile pozitivne na OvHV-2, imalo prisutna anti-MKG protutijela iz kolostruma. Maternalna protutijela ostaju detektabilna do dva i pol mjeseca starosti (LI i sur., 1998.). Aktivna sinteza protutijela počinje u dobi od šest mjeseci starosti te 50% janjadi serokonvertira u dobi od sedam do osam mjeseci. Do prve godine starosti protutijela su prisutna kod 80-90% janjadi što odgovara postotku seropozitivnih odraslih ovaca (LI i sur., 1998.). Genom OvHV-2 virusa je identificiran u uzorcima iz probavnog, respiratornog i urogenitalnog trakta ovce, te u sjemenu ovnova (HUSSY i sur., 2001.). Ova opažanja upućuju na mogućnost vertikalnog prijenosa na potomstvo. Većinom se prijenos s rezervoara na osjetljivog domaćina odvija u neposrednoj blizini, ali zabilježeni su i slučajevi prijenosa na udaljenosti do 5 km (ANONYMOUS, 2012.). Tradicionalno se i koze smatraju prenosiocima OvHV-2 (HEUSCHELE, 1988.; WIYONO i sur., 1994.). Horizontalni prijenos između domaćina ostalih vrsta se smatra nemogućim te su oni “dead end hosts” (ACKERMANN, 2006.). Horizontalni prijenos nije moguć zbog veze stanice i virusa te nemogućnosti da se virus odvoji od stanice (LI i sur., 2014.). Većinom se prijenos s

rezervoara na osjetljivog domaćina odvija u neposrednoj blizini, ali zabilježeni su i slučajevi prijenosa na udaljenosti do 5 km (ANONYMOUS, 2012.).

2.7.8. Patogeneza

Općenito životni ciklus herpesvirusa započinje kada uzročnik dođe u kontakt s površinom stanice domaćina te se veže za specifične stanične receptore. Za CpHV-1 se vjeruje da inficira koze putem respiratornog ili genitalnog puta, pokazujući visoki tropizam prema genitalnom traktu. (TEMPESTA i sur., 2001.; TEMPESTA i sur., 2004.). Kada CpHV-1 zarazi kozu preko sluznice nosa, replicira se lokalno i širi nakon viremije do genitalnog trakta gdje može uzrokovati pobačaj. Suprotno tome, kada virus zarazi kozu preko sluznice rodnice, replicira se samo lokalno, bez širenja na druge organe i tkiva, te se izlučuje samo vaginalnim putem. Nakon primarne infekcije, CpHV-1 uspostavlja latentnu infekciju u neuronima, a mjesta latencije su dokazana u trećem i četvrtom sakralnom gangliju, kao i u trigeminalnom gangliju (TEMPESTA i sur., 1999a.). Reaktivacija virusa iz mjesta latencije bila je iznimno teška za dokazati u prirodnim i eksperimentalnim uvjetima (BUONAVOGLIA i sur., 1996.), no reaktivacija virusa i njegovo izlučivanje postignuti su samo nakon primjene visokih doza deksametazona. U prirodnim uvjetima, reaktivacija i izlučivanje virusa vaginalnim putem uočeni su tijekom estrusa kod koza s niskim titrom neutralizirajućih protutijela (TEMPESTA i sur., 2001.). U istraživanju patogeneze CpHV-1 (TEMPESTA i sur., 1999b.), tri koze razvile su povišenu tjelesnu temperaturu ($39,9 \pm 40,48^{\circ}\text{C}$) četvrti dan nakon inokulacije koja je trajala sedam dana. Tijekom febrilne reakcije, koze su bile leukopenične ($2.500 \pm 500/\text{mm}^3$). Međutim, tijekom 30 dana promatranja nisu uočeni drugi klinički znakovi, osim kod jedne životinje koja je na sedmi dan razvila vezikulo-ulcerativne lezije na stidnici. Kasnije su lezije postale kružne, a kako je zacjeljivanje napredovalo, na tim područjima su se formirale kraste, koje su otpale nakon nekoliko dana, a cijeli proces je završen u sljedećih osam do 10 dana.

Receptori na stanici domaćina za koje se vežu OvHV-2 i CpHV-2 još uvijek nisu poznati (RUSSELL i sur., 2009.). Istodobno proteinska ovojnica virusa se stapa sa staničnom opnom pa kao nukleokapsida dospije u staničnu jezgru gdje se umnaža. U daljnjem se tijeku razvijaju razarajuća (litička) ili prikrivena (latentna) zaraza. U litičkom obliku

bolesti u stanici domaćina prepisuju se i umnažaju virusni litički geni pa stanica naposljetku propada (KUMATI, 2016.). Prilikom latentne zaraze u stanicama domaćina nakupljaju se transkripti prikrivenih gena (engl. latency associated transcripts) koji se dugo vremena pa i doživotno, mogu održavati bez očitovanja bolesti. Različiti uzroci mogu potaknuti pretvorbu prikrivenih u razarajuće gene kojih umnažanje vodi u smrt stanice (KUMATI, 2016.). Svi herpesvirusi mogu uzrokovati latentne infekcije. Uvjet za učinkovitu latentnu infekciju je da stanica koja nosi virus bude dugovječna i da nije uništena niti kroz apoptozu niti kroz eliminaciju od strane imunološkog sustava. Dugovječne stanice koje se ne dijele, a u zadnjoj fazi diferencijacije, kao što su neuroni i limfociti ispunjavaju ovaj uvjet (PATEL i DIDLICK 2008). Istraživanja koja su ispitala umnažanje OvHV-2 ukazuju na faze replikacije virusa kroz koje OvHV-2 prolazi i u rezervoaru, i u osjetljivom domaćinu (LI i sur., 2008., TAUS i sur., 2010.). U ovci kao rezervoaru se virus u početnoj fazi nedugo nakon infekcije umnaža u alveolarnom epitelu pluća. Nakon toga, virus prelazi u krv gdje ima tropizam prema limfocitima u kojima ima sposobnost uspostavljanja latentne infekcije (LI i sur., 2008., TAUS i sur., 2010.). Potom virus napada respiratorni sustav, osobito pluća i nosne sinuse, zatim napušta domaćina u obliku nevezanog na stanice. Eksperimentalno zaražene prijemljive vrste (bizon i zec) ukazale su na sličnu replikaciju kao i u ovaca. (CUNHA i sur., 2012.). Pretpostavlja se da virus ima sposobnost promjene tropizma prilikom ulaska i izlaska iz organizma (LI i sur., 2014.). Razvoj imunološkog odgovora koji minimalizira štetu na tkivu domaćina tijekom replikacije virusa i samoograničavajuća replikacija virusa zbog promjena u tropizmu virusa, odražava međusobnu prilagodbu virusa i domaćina tijekom dugotrajne koevolucije (LI i sur., 2014.).

2.7.9. Klinička slika

CpHV-1 povezan je s dva različita sindroma kod koza: smrtonosnom sistemskom bolešću u jaradi i genitalnom bolešću koja dovodi do balanopostitisa, vulvovaginitisa i pobačaja kod odraslih jedinki. U jaradi klinički znakovi bolesti su: progresivna slabost, groznica, bol u abdomenu, cijanoza i ubrzan rad srca. Također dolazi do pojave vodenastih, žutih izmeta prošaranih krvlju, ali bez proljeva. Smrt nastupa unutar prvih pet

dana, a prethodi joj komatozno stanje. Neka jaradi preživi ili uquine nakon dva mjeseca u stanju slabosti (LLANOS-SALINAS i sur., 2018).

Maligna kataralna groznica je akutna, generalizirana i često fatalna bolest papkara (*Artiodactyla*) - goveda, bizona, jelena i dr. Očituje se općim infekcijskim sindromom (OIS), kataralnokrupoznom upalom sluznica glave i probavnog sustava, keratokonjunktivitisom i često kliničkim znakovima oboljenja središnjeg živčanog sustava (SŽS). Letalitet je blizu 100%. Tijek bolesti se kreće od perakutnog do kroničnog. Eksperimentalno je dokazano da inkubacija traje 9-77 dana, a nepoznato je trajanje kod prirodne infekcije. Nakon infekcije, ovisno o zahvaćenim organima, u domaćina su uočena različita klinička očitovanja. U većini slučajeva rani klinički znakovi bolesti započinju s povišenom tjelesnom temperaturom i letargijom, praćeni s kataralnim nosnim iscjetkom, ulceracijom sluznica te ponekad zamućenjem rožnice. Dizenterija ili krvavi proljev je također jedan od učestalijih znakova bolesti (RUSSELL i sur., 2009., O'TOOLE i LI, 2014.). Iscjedak iz nosa i očiju mogao bi biti pokazatelj oblika MKG koji zahvaća glavu i oči, dok oblici koji zahvaćaju probavni sustav, SŽS ili kožu, se lako mogu pomiješati s drugim bolestima (ZHU i sur., 2018.). Klinička slika kod goveda inficiranih s OvHV-2 se očituje otečenjem kapaka, obostranim keratokonjunktivitisom uz zamućenje rožnice ("blue eye"), krastama po sluznici nosnog ogledala i nosnicama, nosnim iscjetkom te slinjenjem. U ranom stadiju bolesti su prisutne erozije nosnog ogledala i nosnica te zamućenje rožnice. Tijekom kasnog stadija bolesti se pojavljuju erozije jezika i erozije bukalne sluznice. Površinski vratni limfni čvorovi (*Ln. cervicalis superficialis*) su povećani. Moguće je otpadanje papaka i roga. Klinički znakovi oboljenja SŽS su nekoordinacija, nistagmus i hiperestezijska (CVETNIĆ, 1997.). Mnoge životinje iz porodice Cervidae su osjetljive na MKG. Općenito je sika jelen najosjetljiviji na infekciju s OvHV-2 (LI i sur., 2014.). Perakutni slučajevi s iznenadnom smrću i akutni slučajevi s hemoragijskim proljevom su često dokumentirani u slučajevima kliničkih ispitivanja na ovim životinjama. Suprotno tomu rjeđe se susreće infekcija jelena s CpHV-2 i obično rezultira blagim i kroničnim kliničkim znakovima kao što su gubitak težine, dermatitis i alopecije. U SAD-u je nedugo nakon otkrivanja patogenog značaja CpHV-2 došlo do višestrukog izbijanja infekcija povezanih s CpHV-2 koje su uzrokovale MKG kod sika jelena i bjelorepog jelena. Primarni znakovi bolesti u tim slučajevima su bili gubitak

težine, dermatitis i pojava alopecija (LI i sur., 2001., CRAWFORD i sur., 2002., KEEL i sur., 2003.). Drugačiju kliničku sliku su razvili sika jeleni u Kini koji su također potvrđeno bili inficirani s CpHV-2. Oboljele košute su očitovale kliničke znakove s povišenom tjelesnom temperaturom ($>41^{\circ}\text{C}$) te seroznim nosnim iscjetkom. Kod svih triju košuta su se razvile vezikule po jeziku. Na nosu oboljele jединke su se razvile manje kraste. Sve oboljele jединke su razvile umjerenu hromost, ali bez interdigitalnih vezikula, znakova truljenja papka ili deformacije papka. Također nije bilo niti dermatitisa i alopecija. Uginuće je nastupilo nakon pet do sedam dana od početka očitovanja kliničkih znakova (ZHU i sur., 2018.).

2.7.10. Patoanatomski i patohistološki nalaz

Pri dokazanoj infekciji s CpHV-1 uočene su lezije u histološkim presjecima jetre, kao što su vakuolarna degeneracija, nekrotični hepatitis i, u nekim slučajevima, prisutnost eozinofilnih intranuklearnih inkluzijskih tijela. Takve promjene su prethodno opisali brojni autori, posebno kod jaradi, i uključuju sljedeće: upalne i nekrotične lezije (ponekad hemoragične) raspoređene u sluznici probavnog trakta; ulceracije sluznice, nekroza i edem, praćeni upalom submukoze u cekumu i kolonu. Jetrene stanice su otečene i vakuolizirane, s prisutnošću intranuklearnih inkluzijskih tijela (LLANOS-SALINAS i sur., 2018). Dokazana je prisutnost virusne DNK u krvi i u svim ispitivanim organima abortiranog fetusa. Vremenski raspon od 31 dan zabilježen između infekcije i pobačaja. Ovaj period između infekcije i pobačaja u može se objasniti slijedom događaja: (1) prolazak virusa kroz nosnu sluznicu; (2) transport mononuklearnim stanicama; (3) prolazak kroz maternične arterije i posteljicu; (4) viremija i infekcija fetusa (KEUSER i sur., 2002).

Patoanatomski i patohistološki nalaz kod malih preživača inficiranih s CpHV-2, CpLHV te OvHV-2 je još uvijek neistražen. Kod MKG-a uzrokovanog infekcijom s OvHV-2 je patoanatomski i patohistološki nalaz razjašnjen. S patološkog gledišta, srce, mozak, pluća i bubrezi su najčešće pogođeni organi, iako se lezije različitog opsega, promjene i učestalosti mogu naći na bilo kojem organu. Patohistološki se lezije očituju akumulacijom

i infiltracijom limfoidnih stanica u nelimfoidnom tkivu te hiperplazijom T-limfocita u limfoidnim organima. Limfocitni vaskulitis je tipičan oblik patohistološke lezije ove bolesti (CVETNIĆ, 1997.; O'TOOLE i LI, 2014.). Na postmortalnom pregledu oboljelih jelana od MKG-a uzrokovanog s CpHV-2, najupečatljivije makroskopske lezije su umjereno otekale tetive ekstenzora i fleksora u blizini zglobova iznad papaka te povećani bubrezi i mezenterijalni limfni čvorovi. Na bubrezima se mogu naći blijeda nekrotična žarišta promjera oko 0,3 cm, a na plućima hemoragična područja (ZHU i sur., 2018.).

Histopatološkom pretragom se pronalaze opsežna oštećenja pluća, bubrega, srčanih zalistaka i tetiva. Točnije, u plućima su vidljiva multifokalna krvarenja i intericijska fibroza popraćena blagom leukoidnom staničnom infiltracijom plućnog parenhima. U patološki promjenjenom bubregu nalazi se velik broj limfoidnih stanica, od toga ponajviše limfocita, te neutrofila, koje infiltrirajući bubrežni parenhim narušavaju staničnu strukturu tkiva zamjenjujući ju ponajviše s limfoidnim stanicama. Srčani mišić nije zahvaćen, ali prisutna je opsežna degeneracija i nekroza tkiva srčanih zalistaka. Histopatološki nije pronađena lezija tetiva. Međutim, u potkožnom tkivu koje okružuje tetive je prisutna opsežna nekroza, infiltracija limfoidnim stanicama te proliferacija fibroblasta. Stijenke arterija u potkožju su infiltrirane limfoidnim stanicama, a mjestimično je uočena i tromboza. Manje opsežne lezije su pronađene u jetri, nadbubrežnoj žlijezdi, jeziku i žlijezdama slinovnicama, i to u obliku manjih krvarenja, infiltracije limfoidnim stanicama te nekroze. Broj limfocita u mezenterijalnim limfnim čvorovima bio je smanjen. Mozak, slezena, koža i mišićje bile su bez lezija (ZHU i sur., 2018.).

2.7.11. Dijagnostika

Iako OvHV-2, CpHV-2 nisu nikad izolirani na staničnim kulturama, dokazana je virusna DNK u kliničkom materijalu (KUMATI, 2016.). Dijagnostika herpesvirusnih infekcija malih preživaca provodi se najčešće na obriscima sluznica nosa i rodnice, te nekoagulirane krvi, tj. izoliranim leukocitima iz uzoraka krvi. Od molekularnih metoda dijagnostike se koristi PCR, posebno kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. Quantitative polymerase chain reaction - q-PCR), te ugnježđena PCR kao vrlo pouzdane

metode pronalaska virusne DNK u uzorcima krvi ili tkiva uzetih od inficiranih životinja (HUSSY i sur., 2001.). Osim izrazite osjetljivosti PCR metoda omogućuje i razlikovanje pojedinih podtipova virusa. Konkretno za dijagnostiku CpHV-2 se koriste specifična kombinacija početnica: 507s/556as i 494s/494as (CHMIELEWICZ i sur., 2001.). Na jednom primjeru testiranja sa specifičnim početnicama je bilo 84% pozitivnih rezultata u seropozitivnim uzorcima spram 56 % pozitivnih nalaza u istom seropozitivnom uzorku s pomoću degeneriranih početnica. Nijedan od seronegativnih uzoraka se nije pokazao PCR pozitivnim, čime je dodatno potvrđena specifičnost PCR testa koji koristi početnice specifične za CpHV-2 virus (LI i sur., 2001.). Metode izbora za dijagnostiku MKG protutijela, kako kod rezervoara, tako i kod prijemljivih vrsta, je komplementarni imunoenzimni test, cELISA (LI i sur., 1994.; FRASER i sur., 2006.). Do otkrića specifičnog epitopa 15 A na površini svih MKG virusa na koji se vežu monoklonska protutijela, nije bilo pouzdane serološke metode za dokaz ovih virusa, odnosno mnogobrojne unakrižne reakcije s drugim virusima su činile serološke testove manje specifičnim (LI i sur., 1994.). Kod janjadi i jaradi se ne koriste serološke metode jer su kod jaradi maternalna protutijela prisutna do tri mjeseca starosti, a u janjadi do dva i pol mjeseca starosti.

2.7.12. Liječenje

Liječenje herpesviroza u stadima ovaca i koza se ne provodi. Radi kontrole bolesti, odnosno povećanja mogućnosti reaktivacije virusa, potrebno je izbjegavati stresna stanja kao što su putovanja, gladovanje, držanje prevelikog broja životinja na istom prostoru i sl. Također je potrebno kozama i ovcama tijekom zime i dužih sušnih razdoblja davati vitaminsko-mineralne suplemente, te redovito vršiti dehelmentizaciju.

2.7.13. Imunoprofilaksa

Eksperimentalno cjepivo za CpHV-1 nije izazvalo nikakve nuspojave, ni lokalne ni opće, te se stoga činilo sigurnim. Osim toga, pokazalo je visoku imunogenost jer su životinje cijepljene dva puta razvile titrove antitijela slične onima koji su opaženi kod prirodno zaraženih životinja. Cjepivo je također induciralo varijabilan stupanj zaštite. S kliničkog stajališta, nijedna cijepljena i izazvana životinja nije imala znakove bolesti, npr.

vaginalne lezije kao kod necijepljenih životinja. Zaštita od infekcije bila je jasno dokazana, ali je ovisila o broju doza cjepiva koje su životinjama dane i o putu izazivanja infekcije. Životinje cijepljene dvaput intranazalno bile su potpuno zaštićene, tj. nije bilo izlučivanja virusa ni kroz nos ni kroz vaginu nakon izazivanja infekcije. Nasuprot tome, životinje koje su bile cijepljene jednom izlučivale su samo male količine virusa i za kraća razdoblja nego necijepljene koze. U životinja kod kojih je izazvana vaginalna infekcija zaštita je bila slabija s obzirom na to da su kod koza cijepljenih dvaput, virus izlučivale tri dana, dok su kod koza cijepljenih jednom izlučivale virus slično kao kontrolne životinje (TEMPESTA i sur., 2001). Jasno je da nije izvedivo predložiti široku upotrebu sluzničnih vaginalnih cjepiva u stadima koza, uzimajući u obzir ekonomske troškove i potrebnu radnu snagu. Ipak, dosadašnje spoznaje ostavljaju otvorenu mogućnost za korištenje infekcije CpHV-1 kod koza kao valjanog životinjskog modela za antivirusnu terapiju i studije imunizacije za HSV-2, umjesto modela miševa, štakora ili zamoraca (CAMERO i sur., 2007).

2.7.14. Javno zdravstvo

Dokazan je potencijal OvHV-2 da zarazi genetski udaljene domaćine, i to u slučaju svinja koje se u kontaktu s OvHV-2 pozitivnom ovcom inficiraju i razvijaju fatalan oblik MKG-a.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

U koza su opisane infekcije s četiri vrste herpesvirusa, no dosad nije dokazano kliničko očitovanje infekcije sa kozjim herpesvirusom 2 i kozjim limfotropnim herpesvirusom, odnosno infekcije tim vrstama se smatraju inaparentnim, dok je poznato kliničko očitovanje infekcije s kozjim herpesvirusom 1. Poznato je da pojedine vrste virusa mogu izazvati u prijemljivih preživača malignu kataralnu groznicu (MKG), a u pojedinih vrsta životinja imaju značajan utjecaj na reprodukciju. Iz navedenog izlaganja razvidan je problem istraživanja. Nadalje, epizootiologija, čimbenici rizika te značenje ovog patogena u reprodukciji koza nepotpuno je poznat i nedovoljno istražen kako u Republici Hrvatskoj tako i u svijetu.

Uz klinički pregled i briseve sluznice nosa, rodnice ili prepucija, uzorke krvi i mlijeka, prikupili su se i epizootiološki podaci u cilju ustanovljavanja prevalencije, kliničke slike i čimbenika rizika za infekciju na razini pojedinačne životinje, ali i na razini farme. Poseban naglasak je dan ispitivanju utjecaja herpesvirusnih infekcija na uspješnost reprodukcije u koza. Da bi se utvrdio utjecaj infekcije na reprodukciju, usporediti će se reproduktivni pokazatelji inficiranih i zdravih koza. Broj ojarane jaradi, broj žive jaradi, fetometrija te uzimanje tjelesnih mjera nakon poroda utvrditi će se postoji li utjecaj infekcije na rast i razvoj jaradi.

Navedeni podaci mogu nam dati bolji uvid u epizootiologiju i patogenezu herpesvirusnih infekcija u koza. Shodno navedenom, temeljna pretpostavka bila je da infekcije herpesvirusima utječu na zdravlje i reprodukciju koza. Opći cilj je odrediti proširenost herpesvirusnih infekcija koza, epizootiologiju bolesti i utjecaj na kozarsku proizvodnju.

Specifični ciljevi:

1. Ustanoviti uvjete držanja koji predstavljaju pogodovne čimbenike za širenje infekcija (veličine stada, različite pasmine, utjecaj hranidbe, i slično).
2. Statističkom analizom podataka prikupljenih od vlasnika stada i rezultata kliničkog pregleda ustanoviti povezanost infekcije herpesvirusima s pojavom određenih kliničkih znakova.
3. Istražiti utjecaj herpesvirusne infekcije na parametre uspješnosti reprodukcije koze (Preganjanje, broj mrtvorodne jaradi, pobačaji, broj rođene jaradi, trajanje laktacije, ulazak u novu sezonu i slično).
4. Fetometrijom, uzimanjem tjelesnih mjera i porođajne težine jaradi utvrdit će se utjecaj infekcije na njihov rast i razvoj.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. PLAN ISTRAŽIVANJA I PLAN UZORKOVANJA

Na osmoj redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj 16. ožujka 2022, temeljem članka statuta 40. Veterinarskog fakulteta, a na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, donesena je odluka o etičkoj prihvatljivosti za istraživanja uzoraka na koje se ne primjenjuje Zakon o zaštiti životinja (NN 102/2017) pod naslovom „Utjecaj herpesvirusnih infekcija u koza na uspješnost reprodukcije“ u svrhu izrade doktorske disertacije (Kl:640-01/22-17/32; Ur. br. 251-61-41-22-01).

Za utvrđivanje potrebnog broja uzoraka koristila se formula za izračun veličine uzorka za studije prevalencije prema NAING i sur., (2022.), s intervalom pouzdanosti od 95% i točnošću od 5%. Prema istraživanju MATIJEVIĆ, (2022.), u okolini Gline utvrđena je prevalencija herpesvirusnih infekcija od 9,8 i 11,6%. Shodno navedenom izračunu, ukoliko je prevalencija 9,8%, veličina uzorka, odnosno N, je $N=135,8$; a za prevalenciju 11,6% $N=157,6$. Time je zaključeno da će minimalan potreban broj životinja za provedbu istraživanja biti 158.

Istraživanje je provedeno na četiri farme s dvije različite pasmine koza na području Republike Hrvatske (Međimurska, Zagrebačka, Koprivničko-križevačka i Bjelovarsko-bilogorska županija). Dvije farme uzgajale su pasminu alpina, a dvije farme od sanske pasmine. Prikupljanje uzoraka započelo je u ožujku 2022. godine a završeno u svibnju 2023. godine. Kriterij za odabir farmi bila je dostupnost životinja za uzorkovanje i neprovođenje sustavne imunoprofilakse herpesvirusne infekcije koza. Istraživanjem su obuhvaćeni koze i jarčevi različite, a uzorkovanje se provodilo tijekom dva stresna razdoblja u uzgoju koza – tijekom gravidnosti u dva navrata: 30-40 dana, te 60-80 dana po parenju, i tijekom ranog puerperija, odnosno u razdoblju od mjesec dana po porodu.

Prije uzorkovanja zajedno s vlasnicima ispunjen je epizootiološki obrazac, koji osim podataka o dobi i spolu jedinke, paritetu, načinu držanja i eventualnim zdravstvenim problemima, uključuje i podatke o dosadašnjoj reprodukciji, pripustu, broju ojarane, mrtvorodne i odbijene jaradi, porođajnoj masi jaradi, tjelesnim mjerama jaradi. Dodatni

epizootiološki podaci prikupljeni su i prilikom uzimanja anamneze, kao i podaci o dosadašnjim parametrima plodnosti i mogućim patologijama graviditeta.

Za potrebe istraživanja uzeti su obrisci sluznice nosa i sluznice rodnice u ženskih jedinki, odnosno prepucija u muških jedinki, zatim se uzorkovala krv iz *venae jugularis* u dvije epruvete, te se uzimao uzorak mlijeka uz pregled mliječne žlijezde. Uz uzorkovanje učinio se i opći klinički pregled svake jedinke. Za vrijeme rasplodne sezone, u razdoblju 30 do 40 dana po parenju, učinila se i dijagnostika gravidnosti transabdominalnim ultrazvučnim pregledom, a gdje je bilo moguće i fetometrija u prvom i drugom tromjesečju graviditeta.

4.1.1. Na razini farme koza

Na svakoj farmi uzet je u obzir ukupan broj životinja i pasmina, broj muških i ženskih jedinki i broj životinja po dobno/spolnoj kategoriji (jarad, šilježice, koze i jarčevi). Uzeti su podaci o načinu držanja i iskorištavanju životinja, te o hranidbi i napajanju. Također, da bi se ispitao unos uzročnika u stado, prikupljeni su podaci o remontu stada, kao i uvođenju mužjaka u stado. Za potrebe utvrđivanja zdravlja stada vlasnici su pitani imaju li koze zdravstvenih poteškoća s neurološkim, respiratornim, probavnim i reproduktivnim problemima na razini stada, imaju li pojavu apscesa, uginuća ili nemaju bolesti na farmi. Prikupljeni su podaci o tretiranju antiparaziticima, imunoprofilaktičkim mjerama i o reproduktivnom menadžmentu.

Farma broj jedan nalazi se u Koprivničko-križevačkoj županiji. Na farmi boravi ukupno 155 koza, te četiri jarca pasmine alpina. Imaju devet bokseva životinja, te ih otprilike 12 boravi po boksu, dok su jarčevi odvojeni, osim u pripusnoj sezoni. Drže se intenzivno, boksevi su međusobno odvojeni rešetkastom ogradom te ne idu na pašu. Hrane se peletiranom hranom i sjenom, te im se neposredno prije sezone parenja pojačava hranidba (krmne smjese za laktaciju) i vitaminizira pripravcima koji sadrže selen. Remont rade iz vlastitog uzgoja, no svake četiri godine uvezu 10-15 % novih koza, uglavnom iz Austrije. Na farmi je zabilježena prisutnost artritisa encefalitisa virusa 2017. godine, a 2021. godine

imali su zabilježeni veći broj uginuća koza radi gangrenoznog mastitisa, no povremeno životinje imaju apscese na različitim djelovima tijela, za što smatraju da je od uboda od ograde. Dehelmintizaciju rade koristeći ivermektin (Iverklin, Dechra, Nizozemska), dva puta godišnje. Ne koriste imunoprofilaktičke mjere. Nemaju druge vrste životinja na farmi.



Slika 3. Izgled boksa na farmi jedan.

Farma broj dva nalazi se u Zagrebačkoj županiji. Na farmi boravi 35 koza i jedan jarac pasmine alpina. Držanje je intenzivno, imaju dva boksa, u dva različita objekta u kojima boravi po 18 koza. Remont rade iz vlastitog uzgoja, a svake godine između ostalih uzgajivača mijenjaju jarca radi genetike. Od antiparazitika koriste ivermektin (Iverklin, Dechra, Nizozemska) i albendazol (Monil 5 %, Genera, Hrvatska) jednom godišnje. Hrane se pripremljenom gotovom smjesom i sijenom, te u zadnjoj trećini graviditeta pojačavaju hranidbu peletiranom hranom, koju produžuju i tijekom laktacije. Povremeno su životinje šepale, i to starije, koje ubrzo nakon pojave kliničkih znakova ugibaju. Ne provode imunoprofilaktičke mjere. Osim koza, na farmi borave kokoši i četiri krmače.

Farma broj tri nalazi se u Međimurskoj županiji. Na farmi boravi 47 koza pasmine sanska koza i dva jarca. Imaju četiri boksa, međusobno odvojeni zidom, a životinje su podijeljene po dobnim kategorijama. Remont rade iz vlastitog uzgoja, a svakih sedam godina kupuju nove koze iz Italije i Slovenije. Hrane se hranom iz vlastitog uzgoja i to smjesom kukuruza, ječma, zobi, tritikalo i soja. Do sada nisu imali većih problema s bolestima, ne provode imunoprofilaktičke mjere, niti koriste antiparazitike. Uz koze, vlasnici imaju i nekoliko teladi koje koriste za tov.



Slika 4. Izgled boksa na farmi 3.

Farma broj četiri nalazi se u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji, a na njoj boravi oko 150 koza i 10 jaraca sanske pasmine. Imaju pet bokseva, od kojih su u jednom gravidne jedinke, u drugom ožarena jarad, u trećem jarci. a ostale koze borave u dva boksa međusobno odvojena daščanom drvenom ogradom. Svake godine rade remont od 20-25% životinja, od kojih pola iz vlastitog uzgoja, a pola uvoze Italije. Imaju učestale probleme s dokazanim artitis encefalitis virusom i gangrenoznim mastitisom. Od antiparazitika koriste albendazol (Monil 5 %, Genera, Hrvatska), jednom godišnje.

Uglavnom se hrane sijenom i zobi, peletiranu hranu dobivaju za vrijeme mužnje odnosno u laktaciji. Ne provode imunoprofilaktičke mjere.

Na farmama u istraživanju ne provodi se sustavni nadzor niti upravljanje reprodukcijom, kao npr. kontrola spolnog ciklusa, metode sinkronizacije estrusa, umjetno osjemenjivanje, dijagnostika graviditeta.

OZNAKA FARME _____	Datum: _____ Mjesto: _____
Pasmina _____	☐ UGINUĆA _____
Broj koza na farmi:	☐ APSCESE _____
☐ MUŠKIH	☐ POJEDINAČNE
☐ ŽENSKIH	☐ VIŠE ŽIVOTNJA
Broj životinja pojedinih kategorija:	DA LI SU SE PRIJE JAVLJALI SLIČNI PROBLEMI
☐ Jarad	☐ DA
☐ Šilježica	☐ NE
☐ koza	TRAJANJE BOLESTI _____
☐ jarac	LJEČENJE _____
A. DRŽANJE	ANTIPARAZITICI
☐ TOV	☐ NE
☐ MLJEČNO	☐ DA (KOJI _____) (KADA/mjesec _____)
☐ PAŠNO DRŽANJE	CIEPLJENJE
☐ PRIVATNI PAŠNJAK	☐ NE
☐ SKUPNA ISPAŠA	☐ DA (KOJA _____) (KADA/mjesec _____)
☐ FARMSKO DRŽANJE	KORIŠTENJE „FLUSHINGA“ ODNOSNO POJAČANE HRANIDBE PRED SEZONU
POJENJE _____	DA ☐ NE ☐
DRŽANJE U BOKSOVIMA	ČIME HRANITE I MIJENJATE LI PREHRANU U RAZLIČITIM FAZAMA PROIZVODNJE, AKO DA KAKO?
☐ NE	_____
☐ DA	_____
Broj boksova: _____	_____
Broj životinja po boksovima: _____	_____
Remont stada	_____
☐ VLASTITI UZGOJ	_____
☐ KUPOVINA	_____
KADA JE BILLO ZADNJE UVOĐENJE NOVIH ŽIVOTNJA _____	_____
UVOĐENJE JARCA	_____
Zdravlje stada	_____
☐ NEMA BOLESTI	_____
☐ RESPIRATORNI _____	_____
☐ PROBAVNI _____	_____
☐ NEUROLOŠKI _____	_____
Napomena _____	_____

Slika 5. Izgled epizootiološkog obrasca.

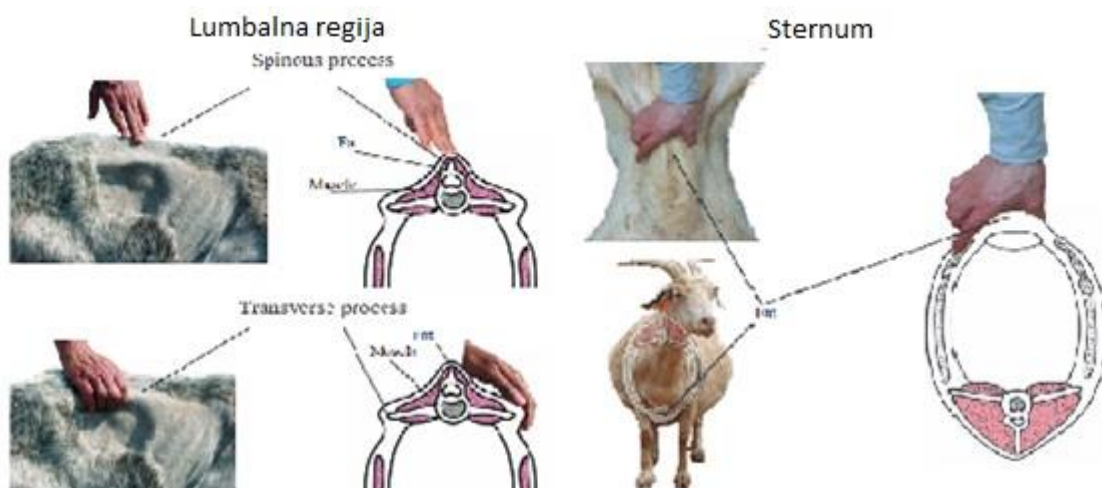
4.1.2. Na razini jedinice

Od vlasnika farmi uzeti su podaci za svaku pojedinu kozu o dobi, datumu pripusta i jarenja počevši od 2020 godine, datumu zadnjeg pripusta, jarenja i broju jaradi,

preganjanju, trajanju laktacije i količine mlijeka te ukupnom broju ožarene jaradi i mogućim pobačajima. O jaradi uzeti su podaci ovisno o načinu držanja i mogućnosti vođenja mjerenja kako slijedi: datum rođenja, porođajna masa, opseg glave, grudnog koša, dužine tijela i datumu odbića odnosno uvađanja mliječne zamjene. Također, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu ustupila je dodatne podatke o mliječnosti.

4.1.3. Klinički pregled

Prilikom prvog uzorkovanja, svaka jedinka dobila je internu oznaku i zabilježen je jedinstveni životni broj. Procijenjena je tjelesna kondicija (engl. body score condition – BCC) (VILLAQUIRAN i sur., 2007.), izmjerena rektalna temperatura, pregledane su vidljive sluznice (konjunktive, usne šupljine, stidnice/prepucija) i zabilježene promjene, provjerena je prisutnost vaginalnog iscjetka, koji je opisan ukoliko je bio prisutan, palpirani su submandibularni i poplitealni limfni čvorovi sa opisanim promjenama veličine i učinjen je pregled mliječne žlijezde (temperiranost, bolnost, promjene konzistencije, ostalo).



Slika 6. Primjer određivanja tjelesne kondicije u koza. (VILLAQUIRAN i sur., 2007)

4.1.4. Krv

Uzorkovanje krvi provodilo se aseptičnim uzorokovanjem iz *v. jugularis* u dvije različite epruvete (dva ml u epruvetu sa EDTA antikoagulansom (Vacutube, LT Burnik,

Vodice, Slovenija), pet ml u epruvetu s gel membranom (Vacutube, LT Burnik, Vodice, Slovenija)). Uzorci su bili transportirani u prijenosnom hladnjaku pri +8°C do Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Potom se na hematološkom analizatoru URIT 5160 (URIT Medical Electronic, Shenzen, Kina) izradio hemogram. Preostali uzorci bili su centrifugirani koristeći centrifugu Labofuge 300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) pri 3500 okretaja/minuti tijekom 15 minuta, a dobiveni supernatant (serum) se odijelio u sterilne Eppendorf epruvete i pohranio na -80°C.

4.1.5. Mlijeko

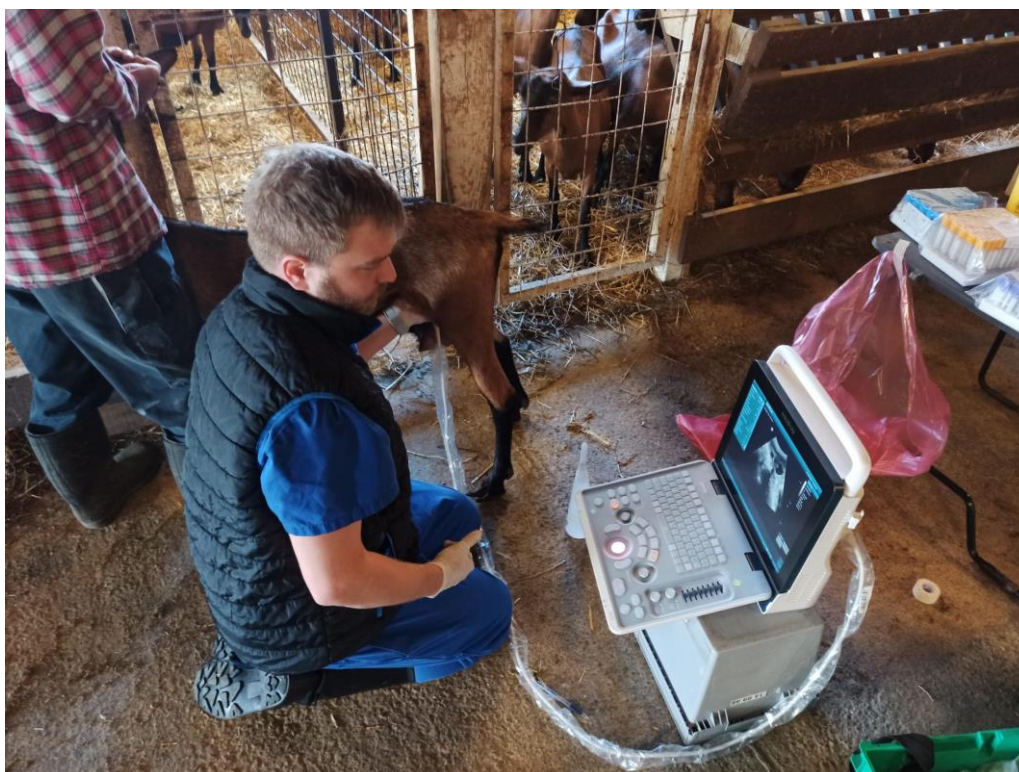
Prije uzimanja mlijeka, sise su dezinficirane alkoholnim maramicama, prvi mlaz se odbacivao. Ručnom mužnjom prikupljeno je mlijeko koza u prethodno označene epruvete za mlijeko (PS Tapado beta, Deltalab, Barcelona, Španjolska) i transportirano u prijenosnom hladnjaku pri +8°C do Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je smrznuto u zamrzivaču pri -19°C. Prilikom obrade uzoraka, mlijeko je odmrznuto u vodenoj kupelji pri temperaturi od 20°C. Nakon odmrzavanja prema ranije opisanom protokolu (POKORSKA i sur., 2016.), epruvete s mlijekom su centrifugirane pri 7000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant masti se uklonio, te se 600 µl mliječnog seruma prebacilo u sterilnu Eppendorf epruvetu. Potom su uzorci bili skladišteni pri temperaturi od -19°C do izolacije DNK. Za potrebe izolacije DNK koristio se IndiSpin Pathogen Mini Kit prema (INDICAL BIOSCIENCE, Leipzig, Njemačka), niže navedenim koracima.

4.1.6. Obrisci sluznica

Obrisci sluznice nosa i stidnice koza, odnosno prepucija u jaraca, uzeti su sterilnim štapićem s vatom, laganim rotiranjem nekoliko puta po površini sluznice, te su zajedno s ostalim uzorcima bili transportirani u prijenosnom hladnjaku pri +8°C. Prilikom obrade uzetih obrisaka, vrh štapića s vatom (otprilike 2 cm) se umočio u jedan ml fosfatnog pufera, višak se štapića odrezao, a vrh s puferom se u Eppendorf epruveti pohranio pri -80°C.

4.1.7. Ultrazvuk i fetometrija

Za pregled ultrazvukom koristio se Mindray Z50Vet uređaj sa konveksom sondom 35C50 2.0-5.0 MHz (Mindray, Shenzhen, Kina), sa radijusom od 50 mm. Transabdominalna ultrazvučna pretraga vršila se u terenskim uvjetima, prislanjajući sondu na bezdlačno kožu s desne strane baze vimena, pri čemu se koristio ultrazvučni gel. U gravidnih jedinki, uz uzimanje briseva, napravljena je fetometrija i to u prvoj trećini graviditeta (između 30. i 40. graviditeta) mjerio se promjer gestacijske vrećice (engl. gestational sac diameter – GSD), a u drugoj trećini gravidnosti, između 60. i 80. dana, pri čemu se mjerio promjer glave (engl. biparietal diameter - BPD) (BERNIER GOSSELIN i sur., 2018.).



Slika 7. Dijagnostika graviditeta i uzimanje fetometrijskih mjera

4.1.8. Tjelesna masa i mjere jaradi

Neposredno prije očekivanog jarenja, vlasnicima su podijeljene prijenosne digitalne vage (NanGuo Electronics, Wuhan), krojački metar, bilježnica i olovka.

Objašnjeno im je kako da uzimaju mjere, kako bi se postigao uniformno prikupljanje podataka. Prije mjerenja tjelesne mase, vagu je potrebno objesiti na čvrsti klin (npr. čavao u zidu). Potom se objesi vreća i tarira vaga, nakon čega se dodaje jare u vreću i zapisuje se životni broj jareta, njegove majke, oca i tjelesna težina u kilogramima.



Slika 8. Mjerenje porođajne težine jaradi

Krojačkim metrom mjerile su se tri dužine: dužina jaradi od nozdrva do početka korijena repa, zatim opseg prsa preko najšireg i najdužeg dijela (preko zadnjeg rebra) i opseg glave, kranijalno od baze uške.

4.2. IZOLACIJA DNK

4.2.1. Priprema uzoraka

Prvo su napravljeni skupni uzorci homogenizata briseva stidnice ili prepucija i sluznice nosa, na način da su se pripremljeni uzorci odmrznuli na sobnoj temperaturi, te su promiješani u vrtložniku. Nakon miješanja, pipetom je uzeto 100 µl homogenizata brisa sluznice nosa i 100 µl homogenizata brisa nosa iste jednike, te se izdvajala virusna DNK prema niže navedenom protokolu. U slučaju da je pretraga dala pozitivnu reakciju, uzorci su se ponovno izolirali, međutim zasebno sluznica nosa i zasebno sluznica stidnice ili prepucija s ciljem utvrđivanja puta izlučivanja virusa. Osim navedenih uzoraka, za PCR pretragu pripremljeni su i uzorci mlijeka koza, tijekom laktacije i neposredno nakon poroda (kolostruma).

4.2.2. Izdvajanje virusne DNK

Za izdvajanje ukupne DNK iz uzoraka korišten je komercijalni komplet IndiSpin Pathogen Mini Kit (INDICAL BIOSCIENCE, Leipzig, Njemačka) sukladno uputama proizvođača.

Kit sadrži:

- Pufer VXL1 1 x 6 ml 1 x 30 ml
- Pufer ACB (koncentrat)1,2 1 x 12 ml 1 x 60 ml
- Proteinaza K 1 x 1.25 ml 1 x 6 ml
- Carrier RNA (poly A) 1 x 310 µg 1 x 310 µg
- Pufer AW1 (koncentrat)1,3 1 x 19 ml 1 x 98 ml
- Pufer AW2 (koncentrat)3 1 x 17 ml 1 x 81 ml
- Pufer AVE 1 x 20 ml 2 x 20 ml

4.2.3. Postupak izolacije DNK korištenjem IndiSpin Pathogen kompleta

Pipetiralo se 20 µl Proteinaze K u epruvetu Ependorf zapremnine do dva ml, i dodalo 200 µl tekućeg uzorka u proteinazu K. Potom se unijelo 100 µl Pufera VXL. Zatvorio se poklopac i promiješala epruveta na vrtložniku. Kako bi dovoljno liziranje bilo postignuto, bitno je temeljito promiješati uzorak i Pufer VXL u homogenu otopinu. Zatim je uslijedila inkubacija na 20-25°C tijekom 15 minuta. Koristila se kratko centrifugiranje epruvete od dva ml kako bi uklonili kapljice na unutrašnjoj strani poklopca. Dodalo se 350 µl Pufera ACB u uzorak, zatvorio poklopac i temeljito pomiješao koristeći vrtložnik. Prethodno je u pufer ACB dodan izopropanol prema uputama. Nakon kratke centrifuge, prenio se lizat na IndiSpin kolumnu postavljenu u epruvetu za sakupljanje od dva ml bez vlaženja ruba. Zatvorio se poklopac i centrifugirao pri 8000 okretaja tijekom jedne minute. IndiSpin kolumna stavljena je u čistu sakupljačicu od dva ml, a prethodna sakupljačica je odbačena. Ukoliko lizat nije potpuno prošao kroz kolumnu nakon centrifugiranja, ponovno se centrifugirao na većoj brzini 14,000 okretaja dok IndiSpin kolumna nije bila prazna. Otvorila se IndiSpin kolumna i dodano je 600 µl Pufera AW1 bez vlaženja ruba. Zatvorio se poklopac i centrifugiralo pri 8000 okretaja jednu minutu. IndiSpin kolumna stavljena je u čistu sakupljačicu od dva ml, a prethodna sakupljačica je odbačena. Otvorila IndiSpin kolumnu i dodalo 600 µl Pufera AW2 bez vlaženja ruba. Zatvorio se poklopac i centrifugiralo pri 8000 okretaja jednu minutu. IndiSpin kolumna stavljena je u čistu sakupljačicu od dva ml, a prethodna sakupljačica je odbačena. Centrifugiranjem na punoj brzini od 14000 okretaja tijekom dvije minute postignuto je sušenje membrane. U zadnjem koraku prenijeta je IndiSpin kolumna u čistu epruvetu zapremnine 1,5 ml, a korištena sakupljačica je odbačena. Zatim se otvorila IndiSpin kolumna, dodalo se 50-150 µl Pufera AVE na središte membrane, zatvorio poklopac i inkubiralo na sobnoj temperaturi (15-25°C) tijekom jedne minute. Zadnjim centrifugiranjem na punoj brzini 14,000 okretaja tijekom jedne minute dobiven je uzorak spreman za lančanu reakciju polimerazom.



Slika 9. Izolirana DNA u eppendorf epruveti od 2 mililitra

4.3. PCR – lančana reakcija polimerazom

4.3.1. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom prema metodi ugniježdene PCR

Panherpes PCR (VANDEVANTER i sur., 1996.) je metoda ugniježdene PCR kojom se umnaža dio gena za herpesvirusnu DNK polimerazu od oko 800 parova baza. Za izvođenje PCR reakcije korišten je PCR uređaj BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cycler, (BioRad, Richmond, SAD).

Pribor i oprema:

- Mikropipeta 1 - 10 μ l, (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Mikropipeta 10 - 100 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Mikropipeta 100 - 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Nastavci za pipetu
- Eppendorf epruvete volumena 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Epruvetice za PCR zapremine 0,2 ml

- PCR uređaj BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cyclers, (BioRad, Richmond, SAD)
- Sustav za provođenje elektroforeze (Scie - Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- Izvor električne struje (CS-300V) (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- Kadica za provođenje elektroforeze (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- Kalupi za agarozni gel s pripadajućim češljevima za jažice
- Parafinski film
- Staklena tikvica zapremnine 100 ml
- Mikrovalna pećnica (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Sustav za detekciju DNK pod ultraljubičastim svjetlom Gel Doc 200 (BioRad, Richmond, SAD)
- Mikrocentrifuga (Biofuge fresco) (Heraeus, Frankfurt, Njemačka)
- Tresilica (Rotamax 120) (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Magnetska mješalica (RTC basic) (IKA, Staufen, Njemačka)
- pH-metar (WTW pH330/SET-1) (WTW, Wilhelm, Njemačka)

Reagensi:

- Otopina vanjskih uzvodnih i nizvodnih početnica
- Voda bez nukleaza (voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD))
- Otopina deoksiribonukleotida (dNTP, TaKaRa), 10 mM.

Reagensi u sastavu komercijalnog kompleta za izvođenje PCR reakcije, Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD):

- Pufer sa uravnoteženim koncentracijama soli potrebnim za izvođenje PCR reakcije, 10x koncentriran
- Otopina magnezijevog klorida, $MgCl_2$, 50 mM
- Otopina deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 mM
- Enzim Platinum Taq polimeraze, 5 U/ μ l.

Početnice korištene u izvođenju molekularne metode (Metabion International AG, Planegg, Njemačka):

- HV-DFA 5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3'
- HV-ILK 5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3'
- HV-KG1 5'-GTC TTG CTG ACC AGN TCN ACN CCY TT -3'
- HV-TGV 5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT -3'
- HV-IYG 5'-CAC AGA GTC CGT RTC NCC RTA DAT -3'.

Reakcijska smjesa za PCR:

Potrebni reagensi za jedan uzorak (dobiva se ukupno 8 μ l reakcijske smjese kojoj se dodaje 2 μ l pretraživanog uzorka):

- 4,3 μ l vode bez nukleaza
- 1 μ l pufera za PCR reakciju (10x)
- 0,3 μ l $MgCl_2$ (50 mM)
- 0,8 μ l dNTP smjese (10 mM)
- 0,5 μ l otopine uzvodne početnice HV-DFA (10 μ M)
- 0,5 μ l otopine uzvodne početnice HV –ILK (10 μ M)
- 0,5 μ l otopine nizvodne početnice HV –KG1 (10 μ M)
- 0,125 μ l Platinum Taq polimeraze (5 U/ μ l).

Komercijalni pripravci korišteni su za dobivanje završne koncentracije reagensa: voda bez nukleaza 4,3 μL , 10X pufer 1 μL , MgCl_2 0.3 μL , dNTP Mix 0.8 μL , HV-DFA, HV-ILK i HV-KG1 početnice po 0.5 μL i Taq polimeraza 0.125 μL . U ukupno 8 μL dobivenog pripravka dodan je 2 μL uzorka, odnosno 2 μL pozitivne i negativne kontrole. Kao pozitivna kontrola, korišten je prethodno dokazani sekvencirani pozitivni uzorak CpHV-2. Kao negativna kontrola, korištena je voda bez nukleaza. Virusna DNK umnažana je početnim korakom denaturacije (početna aktivacija enzima polimeraze) pri 95 °C u trajanju od pet minuta, praćeno s 45 ciklusa denaturacije DNK lanca pri 95 °C u trajanju od 30 sekundi, vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza pri 46 °C i produljenje početnica pri 72 °C u trajanju od 1 minute. Završno produljenje umnoženih sljedova DNK pri 72 °C u trajanju od deset minuta.

Potrebni reagensi za jedan uzorak (dobiva se ukupno 4 μL reakcijske smjese kojoj se dodaje 1 μL PCR produkta):

- 2,4 μL vode bez nukleaza (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 0,5 μL pufera bez magnezija za PCR reakciju (10x) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- 0,15 μL MgCl_2 (50 mM) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- 0,4 μL dNTP smjese (10 mM) (dNTP, TaKaRa),
- 0,25 μL otopine uzvodne početnice HV-TGV (10 μM)
- 0,25 μL otopine nizvodne početnice HV –IYG (10 μM)
- 0,063 μL Platinum Taq polimeraze (5 U/ μL) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)

Virusna DNK umnažana je početnim korakom denaturacije (početna aktivacija enzima polimeraze) pri 95 °C u trajanju od pet minuta, praćeno s 45 ciklusa denaturacije DNK lanca pri 95 °C u trajanju od 30 sekundi, vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza pri 46 °C i produljenje početnica pri 72 °C u trajanju od jedne minute. Završno, konačno produljenje umnoženih sljedova DNK pri 72 °C u trajanju od 7 minuta.



Slika 10. PCR uređaj BioRad, sa protokolom za umnažanje dijela gena herpesvirusne DNK

4.3.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu Reagensi:

- Agaroza u prahu (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Tris baza (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Ledena octena kiselina (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Boja za DNK u agaroznom gelu (GelStar, Lonza Rockland, SAD)
- Biljeg veličine DNK odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNA veličine po 100 pb (100 bp DNA ladder) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- Otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo (Blue Juice Gel Loading Buffer) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD).

Priprema radnih otopina

50X koncentrirana otopina TAE:

Reagensi:

- Tris baza 242 g (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Ledena octena kiselina 57,1 g (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- EDTA (0,5 M) 100 ml (Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
- Destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerenе su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici. Vrijednost pH otopine bio je 8,5.

Priprema 0,5 M otopine EDTA:

Reagensi:

- EDTA 186,1 g
- Destilirana voda do 1 l.

U staklenu posudu odmjerenе su navedene količine reagensa i otopina je dopunjena destiliranom vodom do volumena 1 l. Otopina je homogenizirana na magnetskoj mješalici. Vrijednost pH otopine bio je 8,0.

Agarozni gel:

Reagensi:

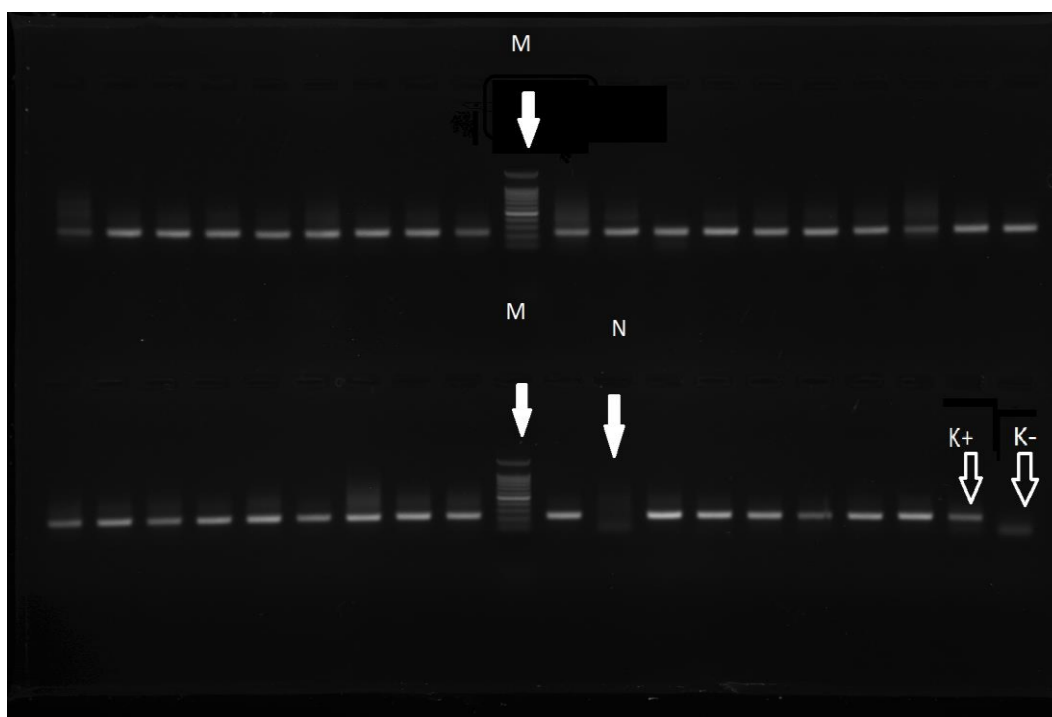
- Agaroz u prahu 0,7 g
- TAE pufer 75 ml
- Boja za DNK 0,25 μ l

Gel je napravljen otapanjem 0,7 g agaroze u prahu u 75 ml TAE, 1X pufera. Otopina agaroze se zagrijala do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja agaroze i kratkotrajnog hlađenja gela dodala se boja za DNK u tekuću agarozu. Da bi se u gelu

dobile jažice u još tekuću agarozu se stavio plastični češalj za formiranje jažica. Nakon polimerizacije agaroze, uklonio se češalj za formiranje jažica i gel se stavio u kadu za elektroforezu u kojoj se nalazi TAE pufer.

Postupak izvođenja elektroforeze u agaroznom gelu bio je slijedeći. Na parafilmu se pomiješalo 3 μ l svakog proizvoda PCR metode s 3 μ l otopine brom fenol plavila. Mješavinu svakog uzorka mikropipetom se prenijelo u jažice gela. U jednu jažicu dodalo se biljeg veličine DNK odsječaka. Elektroforeza se provodila u uređaju za elektroforezu, pri naponu 100 V, jakosti struje 80 mA, u trajanju 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze prisutnost PCR proizvoda u gelu provjerila se pod UV svjetlom u komori za snimanje gelova (Uvidoc HD6, Cambridge Engleska, UK), te se gel fotografirao pomoću kamere s filtrima za UV svjetlost koja je bila spojena s računalnim programom koji omogućuje pohranu fotografije, u svrhu dokumentiranja uspješnosti PCR reakcije.

Slika Prisutnost PCR produkata u agaroznom gelu pod UV svjetlom.



Slika 11. Očitavanje agaroznog gela pod UV svjetlom. Oznaka M označava mjesto markera odnosno biljega veličine DNK odsječaka, N negativnog uzorka, K⁺ je pozitivna kontrola a K⁻ negativna kontrola.

4.3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a

Nukleotidni slijed umnoženog odsječka virusne DNK određivan je u svrhu molekularne tipizacije kozjih herpesvirusa na području RH. Dio slijeda nukleotida određen je u tvrtki Macrogen, Amsterdam, Nizozemska pomoću ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, California, SAD) na uređaju 3730 x 1 DNA analyzer istog proizvođača, a korištene su iste početnice kao u opisanom PCR-u, dok je drugi dio purificiran odnosno pročišćen koristeći NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL, Düren, Njemačka) komplet prema uputama (VOGELSTEIN i GILLESPIE, 1979.), i poslani na određivanje slijeda nukleotida na istom uređaju u LGC Limited (London Velika Britanija).

4.3.4. Postupak pročišćavanja PCR produkata

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up komplet za 250 uzoraka sadrži:

- Vežući pufer NTI 200 mL
- Pufer za ispiranje NT3 (Concentrate)* 2 x 50 mL
- Pufer za eluciju NE** 13 mL 13 mL 30 mL
- NucleoSpin ® Gel and PCR Clean-up kolumne 250
- Sakupljačice (2 mL) 250

Osim navedenog, potrebno je:

- 96–100 % etanol
- 1.5 mL Ependorf epruvete
- Vršni nastavci za pipete
- Pipete (10, 100 i 1000 µl)
- Mikrocentrifuga
- Termotreskalica
- Vrtložnik

Pomješao se jedan volumen uzorka s dva volumena NTI pufera (u ovom slučaju 10 µL PCR reakcije i 20 µL NTI pufera). Umetnulo se NucleoSpin® Gel i PCR Clean-up kolumnu u sakupljačicu (dva mL) i prenijelo do 700 µL uzorka. Centrifugiralo se 30 sekundi na 11,000 okretaja. Odbacila se tekućina koja je prošla kroz kolumnu i vratila kolumna u novu sakupljačicu. Pipetom se prebacio preostali uzorak ako je bilo potrebno i ponovilo centrifugiranje. Dodalo se 700 µL NT3 pufera u NucleoSpin® Gel i PCR Clean-up kolumnu. Zatim je uslijedilo centrifugiranje tijekom 30 sekundi na 11,000 okretaja. Odbacila se tekućina koja je prošla kroz kolumnu i vratila kolumna u sakupljačicu. Ponovnim centrifugiranjem tijekom jedne minute na 11,000 okretaja potpuno se uklonio NT3 pufer. Potpuno uklanjanje etanola postiglo se inkubacijom kolumni 2–5 minuta na 70 °C prije elucije. Nakon toga se kolumna umetnula u novu 1.5 mL Ependorf epruvetu. U kolumnu koristeći pipetu stavilo se 15–30 µL NE pufera i inkubiralo se na sobnoj temperaturi (15–25°C) tijekom jedne minute. Završnim centrifugiranjem pri 11000 okretaja tijekom jedne minute dobio se pročišćeni PCR produkt.

Daljnju analizu dobivenih DNK slijedova radilo se pomoću računalnog programa MEGA 11 (TAMURA i sur., 2021.). Pomoću navedenog programa načinjeno je višestruko sravnjivanje DNK slijedova i identifikacija postojećih polimorfničkih mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka. Koristeći metodu povezivanja susjednih nukleotidnih slijedova (engl. neighbour-joining, NJ) i metodu najveće vjerojatnosti (engl. maximum likelihood, ML) nukleotidni slijedovi dobivenih odsječaka virusne DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim slijedovima iz banke gena (Gen bank) za pojedine vrste kozjih herpesvirusa u cilju izrade filogenetskog stabla.

4.4. SEROLOGIJA

4.4.1. Imunoemnzimni test za dokaz izloženosti CpHV-1

Za dijagnostiku CpHV-1 u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i Zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od seroloških

metoda korišten je ELISA test (GREGORY i sur., 2020.). Korišten je komercijalni komplet Eradikit TM CpHV1 (IN3 Diagnostics, Torino, Italy).

Sadržaj komercijalnog kompleta Eradikit TM CpHV1 (IN3 Diagnostics, Torino, Italija):

- Pufer za razrjeđivanje seruma (1c): 1 bočica od 60 ml
- 20x pufer za ispiranje (2): 1 bočica od 60 ml
- 100x konjugat (PG.02): 1 bočica 0,3 ml
- Pufer za razrjeđivanje konjugata (3b): 1 bočica od 25 ml
- Otopina supstrata (4c): 1 bočica 25 ml
- Stop otopina (5c): 1 bočica 25 ml
- Negativni kontrolni serum 0,2 ml
- Pozitivni kontrolni serum 0,2 ml

Pribor i oprema potrebni za izvođenje testa:

- Mikropipeta 2-20 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Mikropipeta 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Multikanalna mikropipeta 10-100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Nastavci za pipetu
- Plastične kadice za pipetiranje
- Jednokratne plastične pipete zapremine 5 ml i 10 ml
- Staklena menzura
- Erlenmayer tikvice zapremine 50 i 1000 ml
- Mikrotitracijska plitica s 96 jažica s ravnim dnom
- Dvostruko destilirana sterilna voda (Sigma Aldrich, Saint Luis, SAD)
- Štoperica
- Ispirač mikrotitracijskih plitica HydroFLEX (TECAN, Männedorf, Švicarska)
- Čitač mikrotitracijskih plitica Sunrise (TECAN, Männedorf, Švicarska)

Princip rada

Ploče unutar kita presvučene su s CpHV-1 rekombinantnim antigenom. Uzorci se razrjeđuju u omjeru 1:20 unutar jažica i inkubiraju na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Nakon ispiranja, peroksidazom označena sekundarna antitijela dodaju se na ploču te se inkubira tijekom 45 minuta. Ispire se ploča, te se dodaje supstrat. Kolorimetrijska reakcija je proporcionalna specifičnoj koncentraciji antitijela.

Protokol

Komplet je bio pohranjen pri temperaturi od +4 °C. Korišteni uzorci prije uporabe bili su pohranjeni pri -20 °C. Pozitivne i negativne kontrole nakon otapanja bile su korištene isti dan, kako bi se izbjeglo ponavljano smrzavanje i odmrzavanje jer se na taj način povećava nespecifičnost reakcije. Prije izvođenja metode, reagensi su bili izvađeni iz kompleta i držani ± 15 minuta na sobnoj temperaturi (± 21 °C) bez izlaganja direktnom sunčevom svjetlu ili izvoru topline. Pufer, kontrole, standardi i konjugati bili su lagano protreseni prije upotrebe u svrhu rastapanja bilo koje komponente kod koje bi moglo doći do grušanja. S pažnjom su stresene bočice kako bi tekućina koja je ostala u poklopcu bila spuštена nazad u otopinu. Kada je bilo potrebno promiješati tekućine u testnoj jažici, to je bilo učinjeno sa plastičnim nastavkom pipete koji je i bio korišten za navedenu jažicu. Svi reagensi nakon korištenja bili su pohranjeni na 4-8 °C.

Postupak

Stavilo se 190 μ l pufera za razrjeđivanje seruma u svaku jažicu, zatim 10 μ l negativne kontrole seruma u jažicu na mjestu A1 na ploči, te 10 μ l pozitivne kontrole seruma u B1 jažicu. Po 10 μ l uzorka seruma stavljeno je u C1 jažicu, te je nastavljeno ispunjavanje jažica u nizu s novim uzorcima. Tako pripremljena ploča inkubirana je na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Pufer za ispiranje razrijeđen je 20 puta u omjeru 1:20 sa pročišćenom vodom. Ploče su isprane (koristeći pufer za ispiranje, te je ostavljeno da se natopi 30 sekundi, a potom se ploča ispraznila kratkim i brzim pokretima na papirnati ubrus) tri puta sa 300 μ l otopine po jažici. Konjugat je razrijeđen 100 puta sa puferom za razrjeđivanje konjugata, te je tako pripremljen dodan u količini od 100 μ l u svaku jažicu. Ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta, a zatim

isprana prema prethodno opisanom načinu. Nakon toga dodano je 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu, te je uslijedila inkubacije ploče na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Koristeći 100 µl stop otopine u svakoj jažici zaustavljena je reakcija, te je ploča očitana na čitaču mikrotitracijskih plitica na 450 nm, unutar 10 minuta.

Interpretacija rezultata

Prije tumačenja rezultata, potrebno je izračunati SV (srednju vrijednost) izmjerene optičke gustoće negativne (NC) i pozitivne kontrole (PC). Odnos (S/P) optičke gustoće uzorka i srednje vrijednosti optičke gustoće pozitivne kontrole računat je po formuli:

$$S/P = (OD_{\text{uzorak}} - SV \text{ OD}_{\text{NC}}) / (SV \text{ OD}_{\text{PC}} - SV \text{ OD}_{\text{NC}}) \times 100$$

Uzorci s reaktivnošću većom ili jednakom 40% smatraju se pozitivnim, odnosno sadrže protutijela za CpHV-1, između 30% i 40% sumnjivim a jednakim ili manjim od 30% smatraju se negativnim.

4.4.2. Imunoenzimni test za dokaz izloženosti artritisa encefalitis virusu

Artritis encefalitis koza je jedna od najčešćih zaraznih bolesti koza. Radi ispitivanja mogućeg utjecaja komorbiditeta na herpesvirusnu infekciju i uspješnost reprodukcije učinila se serološka pretraga seruma koristeći komercijalni komplet ELITEST – MVV/CAEV HYPHEN BioMed ZAC Neuville Université (Neuville sur Oise, Francuska). Imunoenzimni test za dokazivanje protutijela za artritis encefalitis virusa u serumu korišten je prema radu BRINKHOF i sur. (2007.).

Princip testa

Jažice na polistirenskoj mikroploči presvučene su sintetičkim peptidom i rekombinantnim proteinom izvedenim od proteina koji sačinjavaju ovojnicu i strukturu odnosno tvori grupno specifične antigene (engl. group specific antigen - GAG) za kozji artritis encefalitis virus. Testni uzorak se inkubira u jažicama te se virusno specifična protutijela vežu (ukoliko su prisutna) za strukturalni protein i/ili protein koji tvori ovojnicu.

Nakon toga se dodaje pročišćeni zečji anti-ovčji IgG obilježen peroksidazom kao sekundarno protutijelo. Kod pozitivnih uzoraka, ova označena protutijela vežu se za prethodno nastali antigen/protutijelo kompleks. Slijedi inkubacija sa supstratom, te dolazi do plavog obojenja unutar jažice. Dodavanjem stop otopine (sumporna kiselina), boja se pretvara u žutu te se reakcija zaustavlja. Ako u uzorku nema protutijela, označena protutijela se neće specifično vezati, zbog čega dolazi do vrlo slabog pozadinskog obojenja.

Komplet se sastoji od:

- Pet ploča koje sadrže okvir sa 12 x 8 obloženim testnim jažicama (sintetički peptid i rekombinantni protein koji predstavljaju ovojnici i dio strukture antigena).
- Bočica koja sadrži 125 µl negativne kontrole (NC) (ovčji serum koji sadrži 0,1% natrijev azid kao konzervans).
- Bočica s 250 mililitara otopine za razrjeđivanje (SD; fosfatni pufer koji sadrži natrijev klorid, Triton stabilizator proteina i 0,05% konzervans Kathon CG).
- Bočica s 75 mililitara otopine za razrjeđivanje konjugata (CD; fosfatni pufer koji sadrži stabilizatore proteina i enzima, te konzervans 0,05% Kathon CG).
- Bočica koja sadrži 0,75 mililitara konjugata (C; zečji anti-ovčji IgG (H + L lanac), označeni s HRP peroksidazom, koji se razrjeđuje prije upotrebe 1:100).
- Bočica s 0,75 mililitara koncentrirane TMB otopine supstrata (S; tetrametilbenzidin otopljen u dimetil sulfoksidu, koji se razrjeđuje 100x prije upotrebe).
- Bočica s 75 mililitara supstratnog pufera (SB; fosfatno-citratni pufer sa 0,006% vodikovim peroksidom).
- Bočica koja sadrži 150 mililitara koncentrirane otopine za ispiranje (WS; fosfatni
- Bočica sa 75 mililitara stop otopine (SS; sumporna kiselina)
- 15 ljepljivih zatvarača za ploču
- Plastična vrećica za neiskorištene trake za ispitivanje.

Materijali potrebni za izradu koji se ne nalaze u kitu

- Destilirana ili deionizirana voda.
- Precizne pipete sa promjenjivim vršnim nastavcima, koje mogu ispipetirati volumen od 1-10 μ l, 20-200 μ l i 200-1000 μ l
- Višekanalna pipeta od 100 μ l s potrošnim nastavcima za dodavanje konjugata, supstrata i sumporne kiseline.
- Treskalica za mikroploču.
- Inkubator sa temperaturom od 37 °C
- Ispirač mikroploča
- Apsorbirajuće maramice
- Fotometrijsko očitavanje za mikroploče, opremljeno s 450 i 595 nanometrskim filterima.

IZVOĐENJE TESTA

Svi uzorci i materijali potrebni za izradu ostavljeni su na sobnoj temperaturi (15-30°C) barem sat vremena prije izvođenja testa.. Otopina za ispiranje pripremljena je razrjeđivanjem koncentrirane otopine za ispiranje (WS) u omjeru 1:25 s destiliranom vodom (20 ml sa 500 ml). Pripremljeno je 50 ml razrijeđene otopine za ispiranje za svaku traku. Napravljeno je predrazrjeđenje uzoraka i kontrola u omjeru 1:100 (4 μ l seruma u 400 μ l otopine za razrjeđivanje uzorka). Konjugat je pripremljen razrjeđivanjem koncentriranog konjugata u omjeru 1:100 s otopinom za razrjeđivanje konjugata (CD) (razrjeđivanjem 10 μ l sa 1 ml po traci ili 100 μ l sa 10 ml po ploči). Supstrat je pripremljen razrjeđivanjem koncentriranog TMB supstrata (S) u omjeru 1:100 s puferom za supstrat (Razrjeđivanjem 10 μ l sa 1 ml po traci ili 100 μ l na 10 ml po ploči).



Slika 12. Ulaganje ploče u spektrofotometar za očitavanje rezultata

Postupak testa

Prije početka testa, prilagođena je temperatura inkubatora na 37°C. Ploče su napunjene s potrebnim brojem stupaca s jažicama, uzimajući u obzir da treba uključiti jedan negativni kontrolni i jedan pozitivni kontrolni uzorak.. Tijekom postupka, su ostajale unutar ploče i bile označene na rubovima. Napravljeno je predrazrjeđenje uzoraka i kontrola u omjeru 1:100. Dodano je 80 μ l otopine za razrjeđivanje u svaku jažicu i 20 μ l razrijeđenog uzorka ili kontrole u svaku odgovarajuću jažicu. Da bi se postiglo potpuno miješanje uzoraka i otopine, ploče su prebačene na treskalicu mikroploča na 1000 okretaja u minuti tijekom pet minuta. Ljepljivi pokrov stavljen je na ploče, te su prenijete u inkubator tijekom 60 minuta na 37°C. Prema uputama za ispiranje, svaka jažica isprana je pet puta, nakon čega je dodano 100 μ l razrijeđene otopine konjugata u svaku jažicu. Preko ploča se zalijepio novi pokrov te su ponovno inkubirane na 37°C tijekom 60 minuta, potom je uslijedilo ispiranje pet puta. Dodano je 100 μ l razrijeđene otopine supstrata u svaku jažicu, zatim su ploče inkubirane na 30 minuta pri 20-25°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 μ l otopine zaustavljanja u svaku jažicu, u istom slijedu i u istim vremenskim intervalima kao i otopina supstrata. Ploče su očitane na čitaču mikrotitracijskih plitica na valnoj duljini od 450 nm, unutar 10 minuta.

INTERPRETACIJA

Svaka ploča validirana je prema uputama, gdje je navedeno da bi svaka negativna kontrola trebala imati apsorbanciju na 450 nm manju od 0,100. Prije tumačenja rezultata, potrebno je izračunati SV izmjerene optičke gustoće negativne (N) i pozitivne kontrole (P). Vrijednost praga računa se prema formuli:

$$(P-N)/4 + N$$

Pri čemu je uzorak (S) NEGATIVAN ako je $S < (P-N)/4 + N$, a POZITIVAN ako je $S \geq (P-N)/4 + N$

4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza dobivenih podataka načinjena je pomoću programskog paketa SAS 9.4. (2002-2012 SAS Institute Inc., Cary, NC, Sjedinjene Američke Države). Snaga testa i procjena broja potrebnih životinja ispitana je pomoću programa G-power test 31.9.4. Deskriptivna statistika učinjena je pomoću SAS modula PROC MEANS i PROC FREQ. Omjeri različitih kategoričkih varijabli analizirani su hi-kvadrat testom pomoću procedure FREQ. Normalna distribucija analiziranih zavisnih varijabli bila je testirana procedurom UNIVARIATE. Multivarijatna analiza podataka (PROC GLM) korištena je za numeričke varijable krvnih parametara kako bi se utvrdile razlike između različitih skupina. Konačni modeli formirani su pomoću procedure GLMSELECT pomoću „forward“ selekcije i korištenjem kriterija temeljenih na „SBC“ validaciji za ulazak varijabli i „AIC“ validaciji za zadržavanje varijabli. Analiza varijance (PROC GLM) korištena je neke pojedinačne numeričke varijable. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata i standardna pogreška srednjih vrijednosti. Grafikoni su izvedeni pomoću procedure SGPLOT. Statistička značajnost je određivana na razini $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Prikupljeni podaci i rezultati

U ovom istraživanju provedeno je uzorkovanje na 248 jedinki vrste koze sa četiri različite farme. Koza je bilo 242, a jarčeva šest. Na farmi jedan, uzorkovano je 155 koza, na farmi dva ukupno 44 koze, na farmi tri 13 koza, a na farmi pod brojem četiri 36 koza. Alpske pasmine bilo je 199 (farme jedan i dva), 49 jedinka sanske koze (farme tri i četiri). PCR metodom ukupno je pretraženo 233 skupnih uzoraka briseva sluznice nosa i stidnice ili prepucija. Od 148 pozitivnih uzoraka, za njih 141 uspješno je određen slijed nukleotida umnožene virusne DNK. Obrisci životinja čiji su skupni uzorci dali pozitivan PCR rezultat su izolirali zasebno, s ciljem određivanja puteva izlučivanja virusa.

Tablica 1. Rezultat PCR pretrage skupnih uzoraka briseva sluznice nosa, stidnice ili prepucija.

PCR	N	Postotak (%)
Negativno	85	36,48
Pozitivno	148	63,51
Ukupno	233	100

U tablici 1. prikazani su rezultati PCR testiranja skupnih uzoraka briseva nosa i sluznice stidnice ili prepucija. Od ukupno 233 pretraga, 85 (36,48 %) su bili negativni, dok je 148 (63,51 %) bilo pozitivno.

Najčešće dokazan virus u skupnim uzorcima bio je CpHV-2, u 38,26% uzoraka, a zatim je slijedio CpLHV s 53 pozitivna uzorka, odnosno 23,04% (Tablica 2.).

Tablica 2. Pojavnost dokazanih vrsta kozjih herpesvirusa

Virus	N	Postotak (%)
Negativno	89	38,70
CpHV-2	88	38,26
CpLHV	53	23,04
Ukupno	230	100

Kada su obrisci pretraženi odvojeno, oba virusa su dokazana i u obriscima nosne sluznice i obriscima prepucija/stidnice. Važno je naglasiti da se CpLHV statistički značajno češće dokazivao u obriscima sluznice stidnice/prepucija od CpHV-2 ($p=0,0146$) (Tablica 3.). Po drugoj strani CpHV-2 je statistički značajno češće dokazan u obrisku sluznice nosa ($p=0,0386$) (Tablica 4.).

Tablica 3. Rezultati PCR pretrage obriska sluznice stidnice ili prepucija ovisno o vrsti virusa

Vrsta virusa	Bris sluznice stidnice ili prepucija		P-vrijednost
	Negativno	Pozitivno	0,0146
CpHV-2	33 (37,5 %)	55 (62,5 %)	
CpLHV	10 (18,19 %)	45 (81,81 %)	
Ukupno	43	100	

Tablica 4. Rezultati PCR pretrage obriska sluznice nosa ovisno o vrsti virusa

Vrsta virusa	Bris sluznice nosa		P-vrijednost
	Negativno	Pozitivno	0,0386
CpHV-2	19 (21,6 %)	69 (78,4 %)	
CpLHV	20 (37,73 %)	33 (62,27%)	
Ukupno	39	102	

Udio pozitivnih rezultata PCR pretrage skupnih uzoraka se statistički značajno razlikovao između promatranih farmi ($P=0,0445$) i kretao se od 58,06%, na farmi 1, do 84,62% na farmi 3 (Tablica 5.).

Tablica 5. Rezultati PCR pretrage skupnih uzoraka obrisaka sluznice na promatranim farmama koza

Broj farme	PCR		P-vrijednost
	Pozitivan	Negativan	
1	90 (58,06 %)	65 (41,94 %)	0,0445
2	23 (65,71 %)	12 (34,29 %)	
3	11 (84,62 %)	2 (15,38 %)	
4	24 (80 %)	6 (20 %)	
Ukupno	148	85	233

I pojavnost dokazanih herpesvirusa se statistički značajno razlikovala na istraživanim farmama ($p=0,0023$). Na svim farmama je prevladavao CpHV-2, osim na farmi 2 gdje je u 72,73 % pozitivnih životinja dokazan CpLHV (Tablica 6.).

Tablica 6. Pojavnost različitih vrsta herpesvirusa na promatranim farmama koza

Broj farme	Vrsta virusa		P-vrijednost
	CpHV-2	CpLHV	
1	62 (71,26 %)	25 (28,73 %)	0,0023
2	6 (27,27 %)	16 (72,73 %)	
3	7 (63,64 %)	4 (36,36 %)	
4	13 (61,9 %)	8 (38,1 %)	
Ukupno	88	53	141

Kada su uspoređeni rezultati PCR pretraga skupnih uzoraka koza sanske pasmine i alpine utvrđena je statistički značajna razlika ($p=0,0071$) (Tablica 7.).

Tablica 7. Pojavnost različitih vrsta herpesvirusa ovisno o pasmini koza

Pasmina	Nalaz skupnog uzorka		P-vrijednost
	Pozitivan	Negativan	0,0071
Alpska koza	113 (59,47 %)	77 (40,52 %)	
Sanska koza	35 (81,4 %)	8 (18,6 %)	
Ukupno	148	85	233

Kada su se usporedile učestalosti pojedinih vrsta herpesvirusa između farmi koje drže istu pasminu koza utvrđeno je da kod farmi koje drže sansku kozu uočena razlika nije bila značajna ($p=1$). Kod dvije farme koje drže alpine uočena je statistički značajna razlika ($p=0,0002$) u pojavnosti CpHV-2 i CpLHV.

Pasmina koza nije imala značajan utjecaj na vrstu virusa koja je dokazana u pojedinačnim uzorcima obriska nosne sluznice odnosno sluznice stidnice/prepucija (Tablica 8. i Tablica 9.).

Tablica 8. Utjecaj pasmine na rezultat PCR pretrage obriska nosne sluznice

Pasmina	Nalaz brisa sluznice nosa		P-vrijednost
	Pozitivan	Negativan	0,0757
Alpska koza	82 (43,16%)	108 (56,84%)	
Sanska koza	25 (58,14%)	18 (41,86%)	
Ukupno	107	126	233

Tablica 9. Utjecaj pasmine na rezultat PCR pretrage obriska sluznice stidnice/prepucija

Pasmina	Nalaz brisa sluznice stidnice/prepucija		P-vrijednost
	Pozitivan	Negativan	0,422
Alpska koza	110 (57,9%)	80 (42,1%)	
Sanska koza	22 (51,16%)	21 (48,84%)	
Ukupno	132	101	233

PCR pretragom skupnih obrisaka jarčeva četiri su dala pozitivni rezultat te dva negativan. Analizom slijeda nukleotida PCR pozitivnih jarčeva, u jednog jarca dokazan je CpLHV, a tri na CpHV-2. CpLHV je dokazan samo u obrisku nosne sluznice dok je CpHV-2 kod jednog jarca dokazan samo u obrisku nosne sluznice, kod drugog samo u obrisku prepucija, a kod trćeg i obrisku nosne sluznice i sluznice prepucija. Kako je broj jarčeva izrazito mali nije bilo moguće napraviti dalju statističku analizu.

5.2. Hematološki parametri u koza i rezultati analize

Radi analize zdravstvenog stanja i mogućeg utjecaja infekcije herpesvirusima na hematološke parametre napravljena je hematološka pretraga za 233 jedinke iz ovog istraživanja. Dobiveni rezultati prikazani su tablično (Tablica 10.).

Tablica 10. Hematoloških parametri istraživane populacije koza

Parametar	N	Srednja vrijednost	SD	Min i maks	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Leukociti ($10^9/L$)	233	8,48	3	2,79-21,59	35,3	8,33	6,30-10,41
Limfociti ($10^9/L$)	233	35,6	12,44	2,56-78,6	34,9	34,24	26,50-42,08
Monociti ($10^9/L$)	233	6,57	2,29	1,49-21,46	34,9	6,24	5,30-7,38
Neutrofili ($10^9/L$)	233	56,16	13,43	4,00-82,52	23,9	57,34	50,31-65,86
Eozinofili ($10^9/L$)	233	1,08	1,04	0,16-6,96	96,1	0,78	0,48-1,28
Bazofili ($10^9/L$)	233	0,23	0,12	0,00-0,50	52,2	0,22	0,14-0,34
Eritrociti ($10^{12}/L$)	187	14,99	2,82	4,10-19,94	18,8	14,75	12,97-17,15
Hemoglobin (g/L)	233	109,49	23,67	68,0-300,0	21,6	105	95-120
Hematokrit (%)	186	48,08	8,98	21,40-72,70	18,6	46,6	42,70-52,50
MCV	186	32,24	3,82	25,00-52,20	11,8	31,9	30,20-34,00
MCH	186	7,13	3,13	5,10-33,90	43,8	6,8	6,40-7,20
MCHC	186	219,78	76,62	156,0-1003,0	34,8	212	205-216

MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu, MCHC prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu

Tablica 11. Razlike u hematološkim parametrima koza između pojedinih farmi

Parametar	Varijacije između farmi				
	N	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)
Leukociti ($10^9/L$)	233	6,20-9,16	6,20-8,93	1,16-3,00	14,15-37,23
Limfociti ($10^9/L$)	233	30,15-40,16	26,39-40,05	8,81-15,30	28,28-50,75
Monociti ($10^9/L$)	233	6,13-6,98	6,04-7,08	1,26-3,56	20,68-50,97
Neutrofili ($10^9/L$)	233	51,53-61,32	51,55-64,65	8,86-15,51	14,49-25,29
Eozinofili ($10^9/L$)	233	0,77-1,27	0,60-1,10	0,56-1,20	62,41-107,45
Bazofili ($10^9/L$)	233	0,18-0,29	0,14-0,31	0,09-0,13	32,68-72,11
Eritrociti ($10^{12}/L$)	187	12,82-18,49	12,98-19,07	1,73-3,16	9,39-20,45
Hemoglobin (g/L)	233	97,22-135,17	93,00-136,00	15,43-40,24	9,44-36,71
Hematokrit (%)	186	40,31-66,58	40,10-67,45	5,18-8,22	9,39-18,98
MCV	186	30,39-36,13	28,80-40,10	2,69-6,63	6,59-21,83
MCH	186	6,90-8,80	6,80-7,10	2,40-5,15	8,25-68,9
MCHC	186	197-270	197-219	7,15-128,25	3,63-47,5

MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu, MCHC prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu

U tablici 11. prikazani su deskriptivni podaci istraživane populacije s varijacijama između pojedinih farmi. Broj ukupnih leukocita bio je $8,48 \times 10^9/L$, a varirali su u rasponu od $2,79 \times 10^9/L$ do $21,59 \times 10^9/L$. Među hematološkim parametrima najviše su varirali eozinofili kod kojih je koeficijent varijabilnosti iznosio 96,1 % te bazofili s vrijednošću istog parametra od 52,2%. Broj eritrocita bio je $14,99 \times 10^{12}/L$, a kretao se u rasponu od $4,10 \times 10^{12}/L$ do $19,94 \times 10^{12}/L$. Koncentracija hemoglobina bila je 109,49 g/L, a

hematokrit je iznosio 48,08 %. Među eritrocitnim je konstantama najviše varirala prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH) s koeficijentom varijabilnosti od 43,8 %.

Tablica 12. Srednja vrijednost i standardna greška promatranih hematoloških parametara za multivarijantni model analize farmi koza.

Parametar		Leukociti ($10^9/L$)	Neutrofili ($10^9/L$)	Hemoglobin (g/L)
Farma	1	9,16±0,22	55,41±1,03	107,53±1,70
	2	6,38±0,50	63,50±2,28	96,40±3,74
	3	8,23±0,82	61,15±3,73	105,83±6,12
	4	7,90±0,52	51,53±2,40	135,17±3,93

Rezultati prikazani u tablici 12. pokazuju da se ukupan broj leukocita statistički značajno razlikuje na farmi 1 i farmi 2 ($p < 0,01$). Ukupan broj leukocita se značajno razlikuje i kod farme 4 ($p = 0,02$). Na farmi 2 se značajno razlikuje prema farmi 3 ($p = 0,05$) i prema farmi 4 ($p = 0,03$), a između farme 3 i 4 nema značajne razlike ($p = 0,73$). Broj neutrofila na hemogramu koza s farma 1 statistički značajno razlikuje od farme 2 ($p = 0,001$), te farma 2 se značajno razlikuje prema farmi 4 ($p = 0,0004$). Broj neutrofila s farme 3 se značajno razlikuju prema farmi 4 ($p = 0,03$). Po mjerenom hemoglobinu krvi koza, farma 1 se statistički značajno razlikuje od farme 2 ($p = 0,0074$) i farme 4 ($p < 0,001$), a rezultat s farme 2 se značajno razlikuju od farme 4 ($p < 0,001$). Nalaz s farme 3 prema farmi 4 se također statistički značajno razlikuje ($p < 0,001$).

Prilikom obrade prikupljenih deskriptivnih podataka, nije zabilježena statistička značajnost između pojedinih parametara s obzirom na pasminu.

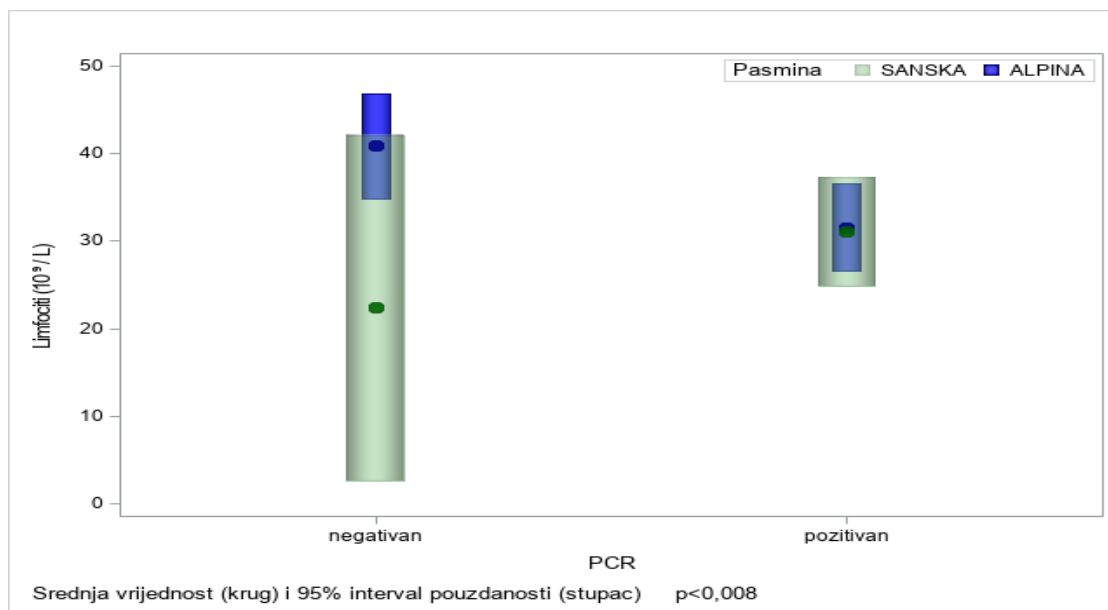
Tablica 13. Rezultati hematološke pretrage istraživane populacije koza s obzirom na nalaz PCR pretrage skupnih uzoraka.

Parametar	PCR	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Leukociti (10 ⁹ /L)	+	146	8,67	2,99	2,81-21,59	34,52	8,51	6,69-10,57
	-	85	8,24	2,99	2,79-16,06	36,26	8,27	6,14-9,98
Limfociti (10 ⁹ /L)	+	146	40,04	12,32	12,56-78,28	34,9	33,57	26,0-43,1
	-	85	30,75	12,84	2,56-78,6	35,65	33,31	28,3-41,2
Monociti (10 ⁹ /L)	+	146	6,63	2,43	2,96-21,46	36,77	6,17	5,22-7,46
	-	85	6,46	2,06	1,49-14,25	31,99	5,3	5,30-7,34
Neutrofili (10 ⁹ /L)	+	146	56,86	12,98	11,18-82,52	22,82	57,68	49,4-66,4
	-	85	55,08	14,31	4,00-74,70	25,98	57,42	51,0-64,3
Eozinofili (10 ⁹ /L)	+	146	0,95	0,85	0,16-6,96	90,08	0,76	0,50-1,06
	-	85	1,31	1,29	0,22-6,80	98,46	0,92	0,48-1,52
Bazofili (10 ⁹ /L)	+	146	0,23	0,12	0,02-0,48	53,29	0,22	0,12-0,34
	-	85	0,23	0,11	0,00-0,50	50,04	0,24	0,14-0,32
Eritrociti (10 ¹² /L)	+	113	16,08	10,98	7,67-128,00	68,28	14,75	13,0-17,3
	-	71	15,08	2,57	10,49-19,94	17,07	14,97	13,3-16,8
Hemoglobin (g/L)	+	145	112,06	26,58	68,00-300	23,71	105	95-125
	-	85	105,36	16,9	69,0-147,0	16,06	103	93-117
Hematokrit (%)	+	112	48,12	8,73	27,30-72,50	18,14	46,45	42,9-53,0
	-	71	48,02	8,77	32,00-72,70	18,27	46,7	42,2-52,2
MCV	+	112	31,91	3,37	25,00-43,00	10,58	31,65	30,0-33,7
	-	71	32,07	2,93	25,80-38,90	9,15	32	30,6-34,0
MCH	+	112	7,77	3,07	5,10-33,90	42,92	6,8	6,40-7,20
	-	71	6,75	0,66	5,10-8,00	9,92	6,8	6,40-7,10
MCHC	+	112	222,18	88,69	160,0-1003,0	39,93	212	207-216
	-	71	216,24	17,52	156,0-266,0	8,33	212	205-217

MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu, MCHC prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu, + PCR pozitivne koze, - PCR negativne koze

U tablici 13. prikazane su vrijednosti promatranih hematoloških parametara krvi koza grupirani u dvije skupine ovisno o pozitivnom ili negativnom rezultatu PCR pretrage. Ukupni hemoglobin bio je viši u PCR pozitivnih koza (112,06 g/L) u odnosu na PCR negativne koze (105,36 g/L). Najveća je razlika zabilježena za MCHC pri čemu je on u

PCR pozitivnih koza iznosio 222,18, a u PCR negativnih 216,24. Statistički značajna razlika bila je u ukupnom broju limfocita ($p=0,008$), pri čemu je broj limfocita u pozitivnih jedinici bio niži ($30,75 \pm 2,05$) od PCR negativnih ($40,04 \pm 2,70$) (Slika 13).



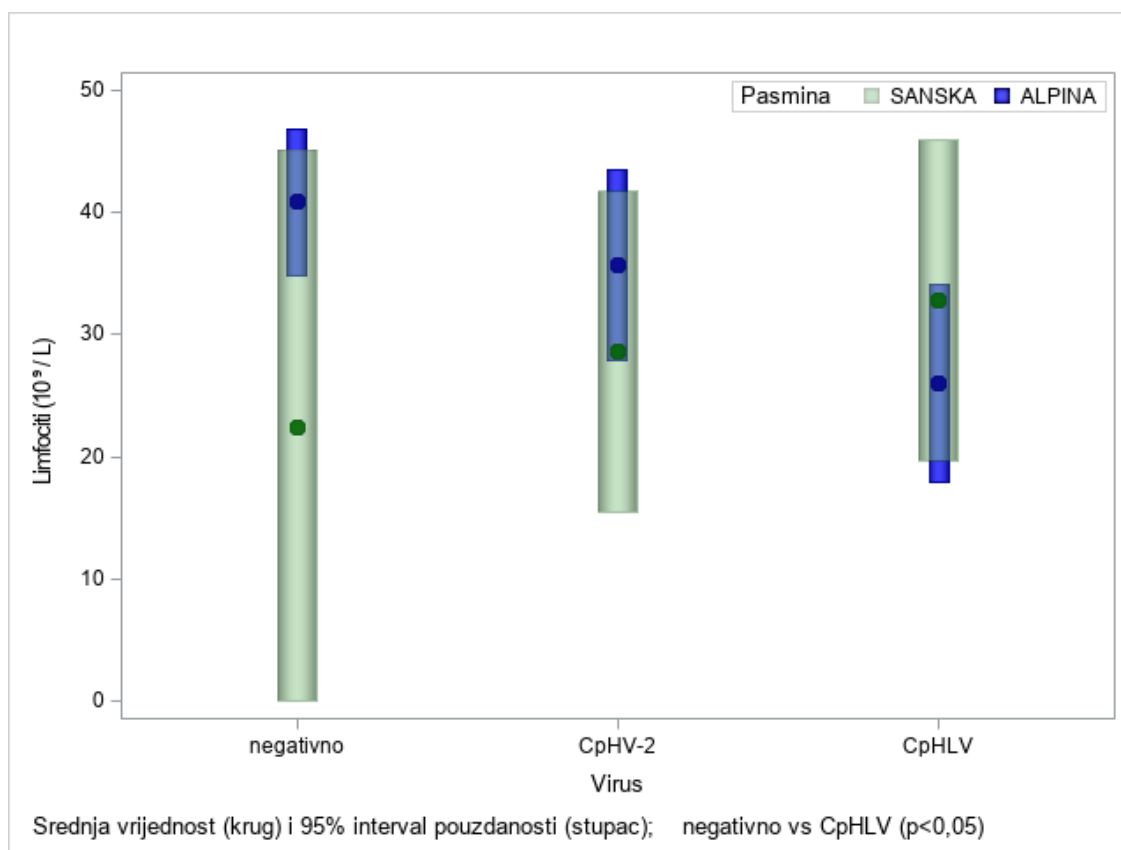
Slika 13. Grafikon prikazuje broja limfocita s obzirom na rezultat PCR pretrage, uključujući i pasminu.

Tablica 14. prikazuje hematološke parametre koza ovisno o vrsti virusa koja je utvrđena u obriscima. Multivarijantni model analize pokazao je statistički značajno manji broj limfocita u CpLHV pozitivnih jedinki ($p=0,0066$) (Slika 14).

Tablica 14. Opisni podaci hematološke pretrage istraživane populacije koza s obzirom na vrstu kozjeg herpesvirusa i negativnih koza.

Parametar	Virus	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Min i maks vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Leukociti (10 ⁹ /L)	Negativno	85	8,24	2,99	2,79-16,06	36,26	8,27	6,14-9,98
	CpHV-2	86	9,01	3,03	3,39-21,59	33,63	8,81	7,30-10,76
	CpLHV	53	8,03	2,64	2,81-14,48	32,86	7,44	6,47-9,72
Limfociti (10 ⁹ /L)	Negativno	85	39,34	12,84	2,56-78,6	35,65	34,62	28,34-41,28
	CpHV-2	86	36,83	12,7	17,99-78,28	32,86	37,64	29,22-45,57
	CpLHV	53	28,2	9,99	12,56-63,33	32,98	29,97	22,92-36,42
Monociti (10 ⁹ /L)	Negativno	85	6,46	2,06	1,49-14,25	31,99	6,24	5,3-7,34
	CpHV-2	86	6,68	1,99	3,02-12,02	29,92	6,3	5,44-7,82
	CpLHV	53	6,54	3,08	2,96-21,46	47,18	5,94	4,94-7,23
Neutrofili (10 ⁹ /L)	Negativno	85	55,08	14,31	4,00-74,70	25,98	57,42	51,05-64,38
	CpHV-2	86	53,46	13,3	11,18-75,15	24,88	54,4	46,74-63,28
	CpLHV	53	62,03	10,97	28,02-82,52	17,69	61,51	54,71-69,86
Eozinofili (10 ⁹ /L)	Negativno	85	1,31	1,29	0,22-6,80	98,46	0,92	0,48-1,52
	CpHV-2	86	0,93	0,72	0,20-5,02	77,46	0,76	0,50-1,10
	CpLHV	53	0,91	1,03	0,16-6,96	113,23	0,66	0,48-0,92
Bazofili (10 ⁹ /L)	Negativno	85	0,23	0,11	0-0,50	50,04	0,24	0,14-0,32
	CpHV-2	86	0,24	0,12	0,02-0,48	51,01	0,24	0,14-0,36
	CpLHV	53	0,22	0,12	0,04-0,46	57,67	0,2	0,12-0,34
Eritrociti (10 ¹² /L)	Negativno	71	15,08	2,57	10,49-19,94	17,07	14,97	13,3-16,0
	CpHV-2	68	16,74	13,98	7,67-128,0	83,53	14,65	13,1-18,1
	CpLHV	43	15,11	2,76	9,45-19,69	18,32	15,3	12,9-17,2
Hemoglobin (g/L)	Negativno	85	105,21	16,9	69,0-147,0	16,06	103	93,0-117,0
	CpHV-2	85	115,11	29,54	83,0-300,0	25,66	109	98-123
	CpLHV	53	105,84	20,54	68,0-163,0	19,41	101	90-118
Hematokrit (%)	Negativno	71	48,02	8,77	32,0-72,7	18,27	46,7	42,2-52,2
	CpHV-2	67	19,08	9,39	27,3-72,5	19,13	46,6	42,7-55,5
	CpLHV	43	46,53	7,52	32,5-63,7	16,17	46	41,5-50,9
MCV	Negativno	71	32,07	2,93	25,8-38,9	9,15	32	30,6-34,0
	CpHV-2	67	32,32	3,22	26,2-39,7	9,98	31,9	30,4-34,8
	CpLHV	43	31,14	3,52	25,0-43,0	11,3	30,7	28,9-33,1
MCH	Negativno	71	6,69	0,66	5,10-8,00	9,92	6,8	6,40-7,10
	CpHV-2	67	7,52	3,9	5,30-33,9	51,9	6,9	6,40-7,30
	CpLHV	43	6,62	0,74	5,10-8,20	11,22	6,8	6,00-7,10
MCHC	Negativno	71	210,3	17,52	156-266	8,33	212	205-217
	CpHV-2	67	231,2	113,86	160-1003	49,24	212	207-217
	CpLHV	43	208,37	9,25	168-222	4,44	210	205-214

MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu, MCHC prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu



Slika 14. Grafikon broja limfocita prema vrsti virusa, zajedno s pasminom.

5.3. Rezultati kliničkog pregleda koža i rezultati analize

Nalaz kliničkog pregleda za potrebe ovog istraživanja uključivao je mjerenje tjelesne temperature, određivanje tjelesne kondicije, pregled vidljivih sluznica, palpaciju limfnih čvorova i mliječne žlijezde, prisutnost iscjetka iz očiju, nosa ili stidnice i prisutnost apscesa.

5.3.1. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije

Tablica 15. Tjelesne temperature i procjene tjelesne kondicije koza

Parametar	N	SV	SD	Min/Max	CV (%)	M	Donji i gornji kvartil
Tjelesna temperatura (C°)	245	39,06	0,62	37,2-40,5	1,6	39,1	38,60-39,50
BCS	241	2,23	0,41	1,25-4,00	18,6	2,25	2,00-2,50

BCS – procjena tjelesne kondicije

Između farme jedan i dva postoji statistički značajna razlika pri procijenjenoj tjelesnoj kondiciji koza. ($p=0.0036$), dok između ostalih farmi nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,18$ do $p=0,85$).

Tablica 16. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije ovisno o pasmini.

Parametar	Pasmina	N	SV	SD	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	M	Donji i gornji kvartil
Tjelesna temperatura (C°)	Alpina	199	39,06	0,42	37,20-40,50	1,68	39,10	38,60-39,60
	Sanska	43	39,02	0,49	37,80-40,10	1,27	39,00	38,60-39,30
BCS	Alpina	198	2,24	0,65	1,25-4,00	18,78	2,25	2,00-2,50
	Sanska	43	2,18	0,39	1,50-3,50	18,18	2,00	2,00-2,25

Nije zabilježena statistička značajna razlika tjelesne temperature i tjelesne kondicije (Tablica 16) između dvije pasmine koza.

Tablica 17. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije koza ovisno o rezultatima PCR pretrage skupnih uzoraka.

Parametar	PCR	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Tjelesna temperatura koza (C°)	+	147	39,08	0,63	37,4-40,5	1,62	39,1	38,6-39,6
	-	85	39,04	0,61	37,2-40,3	1,56	39,1	38,7-39,5
BCS	+	148	2,32	0,44	1,25-4,00	19,82	2,25	2,00-2,50
	-	85	2,24	0,37	1,50-3,25	17	2,23	2,00-2,50

Tablica 18. Tjelesna temperatura i procjena tjelesne kondicije koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa

Parametar	Virus	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Tjelesna temperatura koza (C°)	Negativno	85	39,04	0,61	37,20-40,30	1,56	39,10	38,70-39,50
	CpHV-2	88	39,12	0,61	37,40-40,30	1,56	39,10	38,70-39,60
	CpLHV	52	39,00	0,65	37,60-40,20	1,67	39,00	38,50-39,50
BCS	Negativno	85	2,23	0,37	1,5-3,25	17	2,25	2,0-2,5
	CpHV-2	88	2,26	0,39	1,25-3,50	17,66	2,25	2,0-2,5
	CpLHV	53	2,20	0,50	1,25-4,00	23,06	2,00	1,75-2,50

U tablicama 17 i 18 prikazani su deskriptivni statistički parametri koza koje su razvrstane ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnih uzoraka odnosno utvrđenoj vrsti herpesvirusa. Rezultati PCR pretrage skupnih uzoraka nisu utjecali na BSC ($p=0,77$). Važno je naglasiti da nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima tjelesne temperature i kondicije ovisno o vrsti dokazanog virusa.

5.3.2. Promjene na sluznicama

Tijekom kliničkog pregleda koza zabilježena je samo zažarenost spojnice kao patološki nalaz. Statistička analiza pokazala je da pasmina, farma, rezultat PCR pretrage te vrsta

virusa ne utječu na pojavu promjena na spojnicama. Učestalost te p vrijednost prikazane su tablično (tablica 19, tablica 20, tablica 21, tablica 22).

Tablica 19. Promjene na konjunktivama koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika.

Broj farme	Sluznica konjunktiva		P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	
1	145 (93,55%)	10 (6,45%)	0.099
2	47 (100%)	0 (0%)	
3	13 (100%)	0 (0%)	
4	36 (100%)	0 (0%)	

Tablica 20. Promjene na spojnicama kod različitih pasmina koza i značajnost uočenih razlika

Pasmina	Sluznica konjunktiva		P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	
Alpska koza	189 (94,97 %)	10 (5,03 %)	0,109
Sanska koza	49 (100 %)	0 (0,0 %)	

Tablica 21. Promjene na spojnicama koza ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i značajnost uočenih razlika

PCR	Sluznica konjunktiva		P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	
Negativno	81 (97,59%)	2 (2,41%)	0,284
Pozitivno	140 (94,59%)	8 (5,41%)	

Tablica 22. Promjene na spojnicama koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa i značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Promjene na konjunktivama		P-vrijednost
	Nema promjena	Ima promjena	0,39
Negativno	83 (97,55 %)	2 (2,25 %)	
CpHV-2	82 (93,18 %)	6 (6,82 %)	
CpLHV	51 (96,23 %)	2 (3,77 %)	

Od patološkog nalaza na usnoj sluznici utvrđena je pojava zažarenosti i erozija (slika 15 i slika 16). Kao i u slučaju promjena na spojnicama nije utvrđen utjecaj farme, pasmine, PCR nalaza ili vrste herpesvirusa na pojavu promjena (tablica 23, tablica 24, tablica 25, tablica 26).

Tablica 23. Promjene na sluznici usta koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Broj farme	Sluznica usne šupljine			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0.173
1	153 (98,71%)	1 (0,65%)	1 (0,65%)	
2	44 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
3	12 (92,31%)	0 (0%)	1 (7,69%)	
4	36 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tablica 24. Promjene na sluznici usta kod različitih pasmina koza i značajnost uočenih razlika

Pasmina	Sluznica usne šupljine			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,495
Alpska koza	197(98,99%)	1 (0,50%)	1 (0,50%)	
Sanska koza	48 (97,96%)	0 (0,0%)	1 (2,04%)	

Tablica 25. Promjene na sluznici usne šupljine u koza ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i značajnost uočenih razlika

PCR	Sluznica usne šupljine			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,235
Negativno	84 (98,82%)	1 (1,18%)	0 (0%)	
Pozitivno	146 (98,65%)	0 (0%)	2 (1,35)	

Tablica 26. Promjene na sluznici usne šupljine koza ovisno o dokazanoj vrsti herpesvirusa i značajnost uočenih razlika.

Vrsta virusa	Sluznica usne šupljine			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,63
Negativno	84 (98,82 %)	1 (1,18 %)	0 (0 %)	
CpHV-2	87 (98,86 %)	0 (0 %)	1 (1,14 %)	
CpLHV	52 (98,11 %)	0 (0 %)	1 (1,89 %)	



Slika 15. Promjene zabilježene na sluznici usne šupljine u alpske koze.



Slika 16. Promjene zabilježene na sluznici usne šupljine u sanske koze.

Kliničkim pregledom sluznice stidnice uočena je pojava erozija i zažarenosti (slika 17).

Nije uočen statistički značajan utjecaj farme, pasmine, PCR nalaza i vrste virusa na promjene sluznice stidnice (tablice 27-30).

Tablica 27. Promjene na sluznici stidnice koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika.

Broj farme	Sluznica stidnice			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	
1	138 (89,03%)	9 (5,81%)	8 (5,16%)	0.091
2	46 (97,87%)	1 (2,13%)	0 (0%)	
3	12 (92,31%)	0 (0%)	1 (7,61%)	
4	31 (86,11%)	5 (13,89%)	0 (0%)	

Tablica 28. Utjecaj pasmine na pojavu promjena na sluznici stidnice

Pasmina	Sluznica stidnice			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,317
Alpska koza	184 (91,09%)	10 (4,95%)	8 (3,96%)	
Sanska koza	43 (87,76%)	5 (10,20%)	1 (2,04%)	

Tablica 29. Utjecaj PCR rezultata na broj životinja s promjenama na na sluznici stidnice

PCR	Sluznica stidnice			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,241
Negativno	80 (94,12%)	3 (3,53%)	2 (2,35%)	
Pozitivno	129 (87,16%)	12 (8,11%)	7 (4,73)	

Tablica 30. Utjecaj vrste herpesvirusa na promjene na sluznici stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Sluznica stidnice			P-vrijednost
	Fiziološka	Zažarena	Erozije	0,29
Negativni	80 (94,12%)	3 (3,53 %)	2 (2,35 %)	
CpHV-2	75 (85,23%)	7 (7,95 %)	6 (6,82 %)	
CpLHV	48 (90,57 %)	4 (7,55 %)	1 (1,89 %)	



Slika 17. Primjer erozija na prijelazu kože stidnice na sluznicu stidnice.

5.3.3. Promjene na limfnim čvorovima

Kako upalna stanja najčešće prati hipertrofija limfnih čvorova, prilikom kliničkog pregleda palpirani su submandibularni, preskapularni, poplitealni i supramamarni limfni čvorovi. Limfni čvorovi su bili povećani u 10/202 alpske i niti u jedne sanske koze, međutim pasmina, farma, rezultat PCR pretrage skupnog uzorka te vrsta herpesvirusa nisu imale utjecaj na pojavu povećanih limfnih čvorova (tablice 31-34).

Tablica 31. Broj životinja s promjenama na limfnih čvorovima na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Broj farme	Limfni čvorovi		P-vrijednost
	Fiziološki	Povećani	
1	146 (94,19%)	9 (5,81%)	0.285
2	46 (97,87%)	1 (2,13%)	
3	13 (100%)	0 (0%)	
4	36 (100%)	0 (0)	

Tablica 32. Utjecaj pasmine na uočeni broj životinja s promjenama na limfnim čvorovima

Pasmina	Limfni čvorovi		P-vrijednost
	Fiziološki	Povećani	0,217
Alpska koza	192 (95,05%)	10 (4,95%)	
Sanska koza	49 (100%)	0 (0%)	

Tablica 33. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s promjenama na limfnim čvorovima

PCR	Limfni čvorovi		P-vrijednost
	Fiziološki	Povećani	0,365
Negativno	80 (94,12%)	5 (5,88%)	
Pozitivno	143 (96,62%)	5 (3,38%)	

Tablica 34. Utjecaj vrste virusa na promjenu limfnih čvorova i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Limfni čvorovi		P-vrijednost
	Fiziološki	Povećani	0,70
Negativni	80 (94,12 %)	5 (5,88 %)	
CpHV-2	85 (96,59 %)	3 (3,41 %)	
CpLHV	51 (96,23 %)	2 (3,77%)	

5.3.4. Prisutnost apscesa

Pojavnost apscesa na farmama je temelj za postavljanje sumnje na pojavu određenih bolesti u stadu od kojih poseban značaj ima kazeozni limfadenitis. Ovo je česta, kronična i najčešće neizlječiva bolest koza koja je mogla značajno utjecati na parametre

promatrane u ovom istraživanju. Upravo iz tog razloga se prilikom kliničkog pregleda obratila pozornost na prisutnost apscesa.

Nije uočen statistički značajan utjecaj farme, pasmine, nalaza PCR pretrage skupnog uzorka i vrste virusa na pojavu apscesa (tablice 35-38).

Tablica 35. Pojava apscesa kod koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Broj farme	Apsces		P-vrijednost
	Nema	Prisutan	0.5825
1	150 (96,77%)	5 (3,23%)	
2	47 (100%)	0 (0%)	
3	13 (100%)	0 (0%)	
4	35 (97,22%)	1 (2,78)	

Tablica 36. Utjecaj pasmine na pojavu apscesa

Pasmina	Prisutnost apscesa		P-vrijednost
	Nema	Ima	1,00
Alpska koza	197 (97,52%)	5 (2,48%)	
Sanska koza	48 (97,96%)	1 (2,04%)	

Tablica 37. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s apscesima

PCR	Prisutnost apscesa		P-vrijednost
	Nema	Prisutan	0,308
Negativno	84 (98,82%)	1 (1,18%)	
Pozitivno	143 (96,62%)	5 (3,38%)	

Tablica 38. Utjecaj vrste virusa na pojavu apscesa

Vrsta virusa	Apsces		P-vrijednost
	Nije prisutan	Prisutan	0,559
Negativni	84 (98,82 %)	1 (1,18 %)	
CpHV-2	84 (96,55 %)	3 (3,45 %)	
CpLHV	52 (96,3 %)	2 (3,7 %)	

5.3.5. Promjene na mliječnoj žlijezdi

U mliječnim pasmina koza zdravlje mliječne žlijezde odnosno vimena je neophodno za ekonomski povoljnu proizvodnju. Kako je ranije navedeno, herpesvirusi izazivaju infekciju žljezdanog tkiva, međutim i brojne druge bolesti utječu na promjenu konzistencije mliječne žlijezde, stoga se prilikom kliničkog pregleda vršio i pregled mliječne žlijezde. Zabilježene patološke promjene konzistencije vimena bile su: atrofija, mesnato i kvrgavo vime. Osim navedenog utvrđene su i druge lokalne promjene na mliječnoj žlijezdi (slika 18), ali njih je bilo malo te nisu uzete u obzir prilikom analize.

Podaci iz tablice 39 pokazuju da je na pojavnost promjena na mliječnoj žlijezdi značajno utjecalo gospodarenje na pojedinoj farmi ($p=0,015$). Po drugoj strani pasmina, infekcija herpesvirusom, kao i vrsta dokazanog herpesvirusa nisu imale značajan utjecaj (tablice 40-42).

Tablica 39. Broj životinja s promjenama na mliječnoj žlijezdi na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Broj farme	Mliječna žlijezda				P-vrijednost
	Fiziološka	Atrofija	Mesnata	Kvrgava	0.015
1	140 (90,32%)	6 (3,87%)	7 (4,52%)	2 (1,29%)	
2	36 (76,60%)	0 (0%)	8 (17,02%)	3 (6,38%)	
3	11 (84,62%)	1 (7,69%)	1 (7,69%)	0 (0 %)	
4	36 (100%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Tablica 40. Utjecaj pasmine na uočeni broj životinja s promjenama mliječne žlijezde

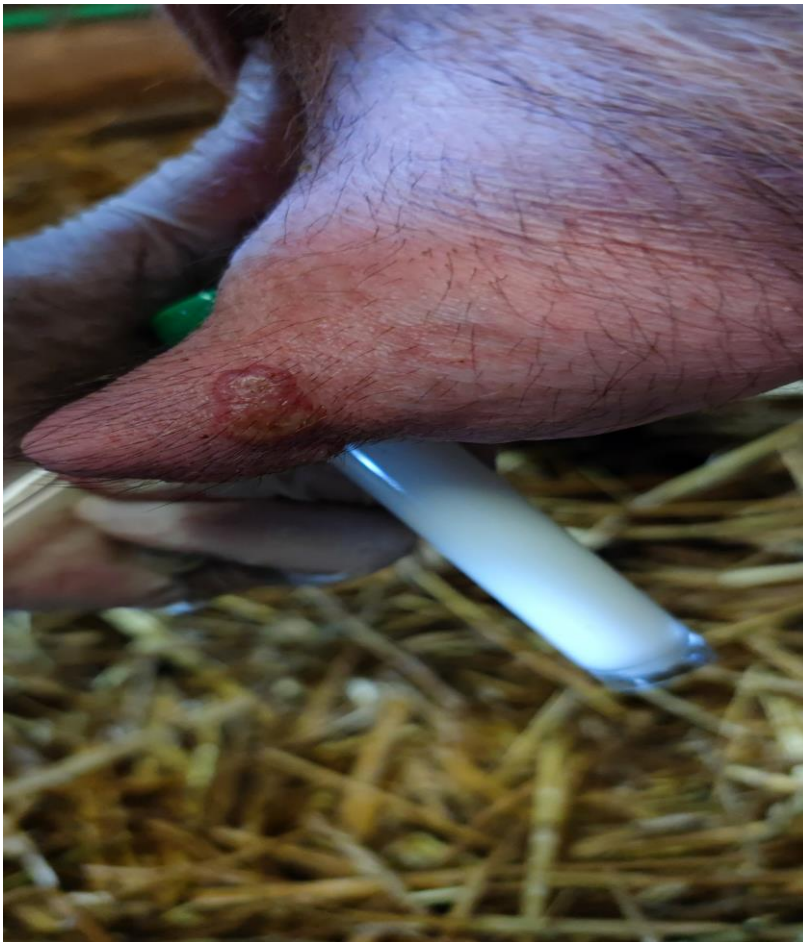
Pasmina	Mliječna žlijezda				P-vrijednost
	Fiziološka	Atrofija	Mesnata	Kvrgava	0,321
Alpska koza	173 (86,933%)	6 (3,01%)	15 (7,54%)	5 (2,51%)	
Sanska koza	47 (95,92%)	1 (2,04%)	1 (2,04%)	0 (0%)	

Tablica 41. Utjecaj PCR rezultata na uočeni broj životinja s pojedinim promjenama na mliječnoj žlijezdi

PCR	Mliječna žlijezda				P-vrijednost
	Fiziološka	Atrofija	Mesnata	Kvrgava	0,450
Negativno	78 (91,76%)	1 (1,17%)	4 (4,7%)	2 (2,35)	
Pozitivno	127 (85,71%)	6 (4,05%)	12 (8,11)	3 (2,02)	

Tablica 42. Utjecaj vrste kozjih herpesvirusa na prisutnost promjena mliječne žlijezde

Vrsta virusa	Mliječna žlijezda				P-vrijednost
	Fiziološka	Atrofija	Mesnata	Kvrgava	0,08
Negativno	78 (91,76 %)	1 (1,18 %)	4 (4,71 %)	2 (2,35 %)	
CpHV-2	80 (90,91 %)	3 (3,41 %)	4 (4,55 %)	1 (1,14 %)	
CpLHV	40 (75,47 %)	3 (5,66 %)	8 (15,09 %)	2 (3,77 %)	



Slika 18. Primjer lezije na sisi vimena.

5.3.6. Prisutnost iscjetka.

Zbog tropizma kozjih herpesvirusa prema respiratornom i genitalnom sustavu, bilježila se prisutnost iscjetka iz nosa i iz stidnice. Zbog malog broja životinja s prisutnim iscjetkom, koze su podijeljene u dvije skupine, one s prisutnim iscjetkom (nos ili stidnica) ili bez iscjetka. Kvaliteta iscjetka također nije mogla biti statistički analizirana.

Ovo istraživanje je pokazalo da utjecaj farme, pasmine, rezultata PCR pretrage skupnog uzorka te vrste dokazanog virusa nije statistički značajan (tablice 43-46).

Tablica 43. Prisutnost iscjetka iz nosa ili stidnice u koza na promatranim farmama i statistička značajnost uočenih razlika

Broj farme	Prisutnost iscjetka		P-vrijednost
	Odsutan	Prisutan	
1	148 (95,48%)	7 (4,52%)	0.078
2	47 (100%)	0 (0%)	
3	11 (84,62%)	2 (15,38%)	
4	35 (97,22%)	1 (2,78)	

Tablica 44. Utjecaj pasmine na pojavu iscjetka iz nosa ili stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Pasmina	Prisutnost iscjetka		P-vrijednost
	Nema	Ima	
Alpska koza	192 (96,48)	7 (3,52%)	0,407
Sanska koza	46 (93,88%)	3 (6,12%)	

Tablica 45. Utjecaj pretrage skupnog uzorka PCR metodom na broj životinja s uočenim iscjetkom i statistička značajnost uočenih razlika

PCR	Prisutnost iscjetka		P-vrijednost
	Nema	Prisutan	
Negativno	83 (97,65%)	2 (2,35%)	0,269
Pozitivno	140 (94,6%)	8(5,4%)	

Tablica 46. Utjecaj dokazane vrste virusa na pojavu iscjetka iz nosa i stidnice i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Iscjedak		P-vrijednost
	Nije prisutan	Prisutan	
Negativno	83 (97,65 %)	2 (2,35 %)	0,20
CpHV-2	85 (96,59 %)	3 (3,41 %)	
CpLHV	48 (90,57 %)	5 (9,43 %)	

5.3.7. Dobna predispozicija i pojava uginuća

Kako bi se ispitala dobna predispozicija na herpesvirusnu infekciju, uspoređena je dob životinja koje su dale pozitivan rezultat PCR metode za skupne uzorke te skupina životinja u kojih je dokazan CpLHV i CpHV-2. Nije dokazana statistički značajna razlika između navedenih skupina.

Kako je moguće da je srednja dob koza uvjetovana uginućem inficiranih životinja usporedio se odnos broja uginulih životinja u promatranom razdoblju u navedenih skupina. Uočene razlike nisu bile statistički značajne (tablica 47 i tablica 48).

Tablica 47. Uginuće koza u razdoblju 2022.-2024. godine ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnih uzoraka

PCR	Uginuće koze		P-vrijednost
	Živa	Uginula	
Negativno	68 (80 %)	17 (20 %)	0,553
Pozitivno	123 (83,11 %)	25 (16,89 %)	

Tablica 48. Uginuće koza u razdoblju 2022.-2024. godine ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa

Vrsta virusa	Uginuće koze		P-vrijednost
	Živa	Uginula	0,288
Negativno	68 (80%)	17 (20 %)	
CpHV-2	69 (78,41 %)	19 (21,59 %)	
CpLHV	47 (88,68 %)	6 (11,32 %)	

5.4. Pokazatelji reproduktivne učinkovitosti

Da bi se mogla analizirati reproduktivna učinkovitost, prikupljeni su podaci o preganjanju pobačajima, mrtvorodenju, stopi koncepcije i podaci o jarčevima koji su bili korišteni u rasplodnoj sezoni, odnosno koji je jarac korišten u pripustu za pojedinu kozu.

5.4.1. Preganjanje

Da bi se pratila uspješnost rasploda praćen je i broj preganjanja kod koza. Ovo je napravljeno posredno, iz prikupljenih podataka o pripustu i duljini graviditeta. Sve koze za koje je vrijeme graviditeta bilo značajno dulje od fiziološkog (150 ± 2 dana) zaključeno je da pripust nije bio uspješan. Statistička analiza dobivenih rezultata prikazana je tablično (tablica 49 i tablica 50). Pojava preganjanja nije bila uvjetovana rezultatima PCR pretrage skupnog obriska sluznica niti dokazanom vrstom herpesvirusa.

Tablica 49. Pojava preganjanja ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka koze

PCR	Preganjanje		P-vrijednost
	Ne	Da	0,79
Negativno	37 (75,51%)	12 (24,49%)	
Pozitivno	44 (73,33%)	16 (26,67%)	

Tablica 50. Pojava preganjanja ovisno o vrsti dokazanog kozjeg herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Preganjanje		P-vrijednost
	Ne	Da	0,78
Negativni	36 (75 %)	12 (25 %)	
CpHV-2	32 (72,73 %)	12 (27,27 %)	
CpLHV	13 (81,28 %)	3 (18,75 %)	

Pojavnost preganjanja je uspoređena između koza koje su parene s jarčevima u kojih su skupni obrisci dali pozitivan, odnosno negativan, rezultat PCR pretrage (tablica 51). Nije ustanovljen značajan utjecaj rezultata PCR pretrage na pojavnost preganjanja.

Tablica 51. Utjecaj PCR rezultata jarčeva na pojavu preganjanja i statistička značajnost uočenih razlika

PCR jarca	Preganjanje		P-vrijednost
	Ne	Da	0,81
Negativno	23 (67,65 %)	11 (32,35 %)	
Pozitivno	26 (70,27 %)	11 (29,73 %)	

5.4.2. Pobačaj

Kao životinja koja je pobacila označena je svaka koza za koju su vlsnici, tijekom njezinog reproduktivnog vijeka, zabilježili bar jedan pobačaj. Broj pobačaja nije uziman u obzir. Nije bilo statistički značajne pojave pobačaja s obzirom na rezultat PCR pretrage skupnog uzorka obriska sluznice niti vrste dokazanog herpesvirusa (tablica 52 i tablica 53). Multivarijantna analiza nije pokazala utjecaj dobi na pojavu pobačaja u PCR pozitivnih koza ($p=0,23$).

Tablica 52. Koze sa zabilježenim slučajem pobačaja ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i statistička značajnost uočenih razlika

PCR	Pobačaj		P-vrijednost
	Ne	Da	0,75
Negativno	57 (89,06%)	7 (10,94%)	
Pozitivno	76 (87,5%)	11 (12,5%)	

Tablica 53. Koze sa zabilježenim slučajem pobačaja ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Pobačaj		P-vrijednost
	Ne	Da	0,09
Negativni	57 (89,06 %)	7 (10,94%)	
CpHV-2	50 (83,33 %)	10 (16,66 %)	
CpLHV	24 (100 %)	0 (0 %)	

5.4.3. Mrtvorodenje

Slično kao i u slučaju pobačaja, kao životinja kod koje se javilo mrtvorodstvo označena je svaka koza kod koje se, tijekom reproduktivnog vijeka, vlasnik zabilježio mrtvorodeno jare barem jednom. Broj slučajeva nije uzet u obzir. Nije bilo statistički značajne pojave mrtvorodstva s obzirom na rezultat PCR pretrage skupnog uzorka obriska sluznice niti vrste dokazanog herpesvirusa (tablica 54 i tablica 55). Multivarijantna analiza nije pokazala utjecaj dobi na pojavu mrtvorodstva u PCR pozitivnih koza ($p=0,09$).

Tablica 54. Koze sa zabilježenim slučajem mrtvorodstva ovisno o rezultatu PCR pretrage skupnog uzorka i statistička značajnost uočenih razlika

PCR	Mrtvorodenje		P-vrijednost
	Ne	Da	0,53
Negativno	54 (94,74%)	3 (5,26%)	
Pozitivno	85 (91,40%)	8 (8,60%)	

Tablica 55. Koze sa zabilježenim slučajem mrtvorodstva ovisno o vrsti dokazanog herpesvirusa i statistička značajnost uočenih razlika

Vrsta virusa	Mrtvorodenje		P-vrijednost
	Ne	Da	0,08
Negativni	39 (92,85%)	3 (7,15 %)	
CpHV-2	47 (94 %)	3 (6 %)	
CpLHV	18 (78,26 %)	5 (21,73 %)	

5.4.4. Uspješnost pripusta

Uspješnost pripusta je za potrebe ovog istraživanja definiran svako parenje koza koje je rezultiralo graviditetom, potvrđeno ultrazvučnom dijagnostikom, ili jarenjem.

Nije bilo statistički značajne razlike u uspješnosti pripusta s obzirom na rezultat PCR pretrage skupnog uzorka obriska sluznica te vrstu dokazanog herpesvirusa kako je to prikazano u tablicama 56 i 57.

Tablica 56. Utjecaj rezultata PCR pretrage skupnih uzoraka na uspješnost pripusta

PCR	Graviditet		P-vrijednost
	Ne	Da	0,894
Negativno	8 (15,09 %)	45 (84,91 %)	
Pozitivno	13 (14,28 %)	78 (85,71 %)	

Tablica 57. Utjecaj dokazane vrste herpesvirusa uspješnost pripusta

Vrsta virusa	Graviditet		P-vrijednost
	Ne	Da	0,456
Negativni	8 (15,09 %)	45 (84,91 %)	
CpHV-2	6 (10,90 %)	49 (89,10%)	
CpLHV	7 (20,59 %)	27 (79,41 %)	

5.5. Utjecaj purperija i graviditeta na izlučivanje herpesvirusa

Uzorkovanje koza, obrisaka sluznica, provedeno je tijekom dva razdoblja: u ranom puerperiju i tijekom prve trećine graviditeta. Rezultati su prikazani tablično, ali je važno naglasiti da se rezultati PCR pretrage skupnih uzoraka kao niti obrisaka nosa odnosno stidnice nisu statistički značajno razlikovali kod koza u ranom graviditetu i puerperiju (tablica 58-60).

Tablica 58. Udio PCR negativnih i pozitivnih koza prema razdoblju uzorkovanja.

PCR	Uzorkovanje		P-vrijednost
	Puerperij	Graviditet	0,7404
Negativno	49 (37,4)	36 (35,3)	
Pozitivno	82 (62,6)	66 (64,7)	
Ukupno	131	102	

Tablica 59. Udio negativnih i pozitivnih obrisaka sluznice nosa prema razdoblju uzorkovanja.

Bris nosa	Uzorkovanje		P-vrijednost
	Puerperij	Graviditet	0,7593
Negativno	72 (54,96%)	54 (52,94%)	
Pozitivno	59 (45,04%)	48 (47,06%)	
Ukupno	131	102	

Tablica 60. Udio negativnih i pozitivnih obrisaka stidnice prema razdoblju uzorkovanja.

Bris stidnice	Uzorkovanje		P-vrijednost
	Puerperij	Graviditet	0,332
Negativno	70 (53,44%)	61 (59,8%)	
Pozitivno	61 (46,56%)	41 (40,2%)	
Ukupno	131	102	

5.6. Serološke pretrage istraživane populacije koza.

5.6.1. Rezultati imunoenzimnog testa za dokaz protutijela za CpHV-1 i interpretacija rezultata.

Na tržištu je dostupan komercijalni komplet imunoenzimnog testa za dokaz protutijela za CaHV-1 u serumu te je prisutnost ovog virusa bilo moguće dokazati i serološki. Ukupno je ELISA-om pretraženo 233 seruma koza od kojih je devet bilo pozitivno, jedan sumnjiv i 223 negativna. Seroprevalencija CpHV-1 određena u ovom istraživanju je 3,87 % (tablica 61). Svi pozitivni uzorci seruma koza dolaze s iste farme (farma broj jedan). Pozitivan je jedan serum jarca, a ostali pozitivni serum dolaze od ženki. Najstarija seropozitivna koza na CpHV-1 ima osam godina, najmlađa tri godine.

Tablica 61. Rezultati ELISA serološke pretrage za dokaz CpHV-1 protutijela u serumu koza

CpHV-1	N	Postotak (%)
Negativni	223/233	95,70
Pozitivni	9/233	3,87
Sumnjivi	1/233	0,43

Nalaz protutijela za CaHV-1 nije ovisio o rezultatu PCR pretrage skupnih uzoraka, niti vrsti virusa kod pojedine koze (tablica 62 i 63).

Tablica 62. Koze s pozitivnim i negativnim nalazom PCR pretrage skupnih uzoraka ovisno o serološkom statusu za CpHV-1

PCR	CpHV-1			P-vrijednost
	negativan	pozitivan	sumnjiv	
Negativno	79 (92,94 %)	5 (5,88%)	1 (1,18 %)	0,195
Pozitivno	144 (97,3 %)	4 (2,7 %)	0 (0 %)	

Tablica 63. Koze s dokazom različitih vrsta herpesvirusa u odnosu na serološki status CpHV-1

Vrsta virusa	CpHV-1			P-vrijednost
	0	1	2	0,128
Negativni	79 (92,94 %)	5 (5,88%)	1 (1,18 %)	
CpHV-2	85 (97,00 %)	3 (3,00 %)	0 (0 %)	
CpLHV	52 (98,36 %)	1 (1,64 %)	0 (0 %)	

5.6.2. Rezultati imunoenzimnog testa za dokaz protutijela za artritis encefalitis virus i interpretacija rezultata.

Artritis-encefalitis koza je jedna od najraširenijih zaraznih bolesti koza koja može imati različita klinička očitovanja. Kako bi se isključio utjecaj ove bolesti na promatrane parametre serumi koza, uključenih u ovo istraživanje, pretraženi su komercijalno dostupnim imunoenzimnim kompletom na prisutnost protutijela na ovaj virus.

Od životinja uključenih u istraživanje njih 82,86% je bilo pozitivno (tablica 64).

Tablica 64. Prikaz broja serološki pozitivnih i negativnih koza na artritis encefalitis virus

Artritis encefalitis virus	N	Postotak
Negativno	36/210	17,14
Pozitivno	174/210	82,86

Tablica 65. Utjecaj artritis encefalitisa na promjenu hematoloških parametara u koza.

Parametri		Leukociti (10 ⁹ /L)		Monociti (10 ⁹ /L)	
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	P vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	P vrijednost
ARTRITIS	Pozitivno	8,35±0,22	0,004	6,44±0,39	0,20
ENCEFALITIS	Negativno	9,94±0,50		6,99±0,39	

Promatrajući serološki status životinja ustanovljeno je da životinje s protutijelima za virus artritis-encefalitisa koza imaju statistički značajno manji broj leukocita (tablica 65).

Iako ova bolest, u okviru kliničke slike, izaziva promjenu konzistencije vimena to u ovom istraživanju nije bio slučaj (tablica 66).

Tablica 66. Utjecaj artritis encefalitis virusa na promjene mliječne žlijezde

Artritis encefalitis	Mliječna žlijezda				P-vrijednost
	Fiziološka	Atrofirana	Mesnata	Kvrgava	0,53
Negativno	31 (86,11 %)	0 (0 %)	4 (11,11 %)	1 (2,78 %)	
Pozitivno	151 (86,78%)	7 (4,02%)	12 (6,90)	4 (2,30 %)	

Isto tako je pokazano da rezultati pretrage skupnih uzoraka obrisaka sluznica na prisutnost herpesvirusne DNK ne ovisi o serološkom statusu jedinke (tablica 67) kao niti pojava pojedine vrste herpesvirusa (tablica 68).

Tablica 67. Utjecaj PCR rezultata na serološki status artritis encefalitis virusa.

PCR	Artritis encefalitis virus		P-vrijednost
	Negativno	Pozitivno	0,20
Negativno	10 (12,82 %)	68 (87,18 %)	
Pozitivno	26 (19,70 %)	106 (80,30 %)	

Tablica 68. Utjecaj vrste virusa na serološki status artritis encefalitis virusa

Vrsta virusa	Artritis encefalitis virus		P-vrijednost
	Negativno	Pozitivno	0,45
Negativni	10 (12,82 %)	68 (87,18 %)	
CpHV-2	15 (18,75 %)	65 (81,25 %)	
CpLHV	10 (21,28 %)	37 (78,72%)	

U tablici 69 vidljivo je da prisutnost protutijela za virus artritisa-encefalitisa koza nije utjecala na porođajnu masu jaradi, masu jaradi pri odbiću, prirast niti broj jaradi.

Tablica 69. Utjecaj artritis encefalitis virusa na porođajnu masu i masu pri odbiću jaradi, prirast i broj rođene jaradi po kozi.

Parametri	Porođajna masa (kg)		Masa jaradi prilikom odbića (kg)		Prirast (kg)		Broj jaradi		
	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	
ARTRITIS ENCEFALITIS	+	4,32 ±0,07	0,66	8,70 ±0,25	0,11	4,38 ±0,26	0,10	1,39 ±0,07	0,07
	-	4,39 ±0,13		7,88 ±0,44		3,48 ±0,46		1,13 ±0,12	

5.6. Utjecaj herpesvirusne infekcija na jarad

Kako bi se ispitao utjecaj herpesvirusnih infekcija na jarad, prikupljene su tjelesne mjere po porodu: opseg glave, opseg prsa, dužina jaradi, porođajna masa, masa pri odbiću, te izračunat prirast od poroda do odbića.

Od fetometrijskih mjera, prikupljene su mjere za promjer gestacijske vrećice i za biparijetalni promjer, dok je premalen broj mjerenja za analizu uzet pri mjerenju presjeka prsa i dužine tri međurebrena prostora.

5.6.1. Mjere po porodu, masa pri odbiću, prirast i broj jaradi.

Prikupljeni podaci o opsegu glave, opsegu prsa, dužini jaradi pri porodu kao i porođajnoj masi prikazani su tablično (tablica 70).

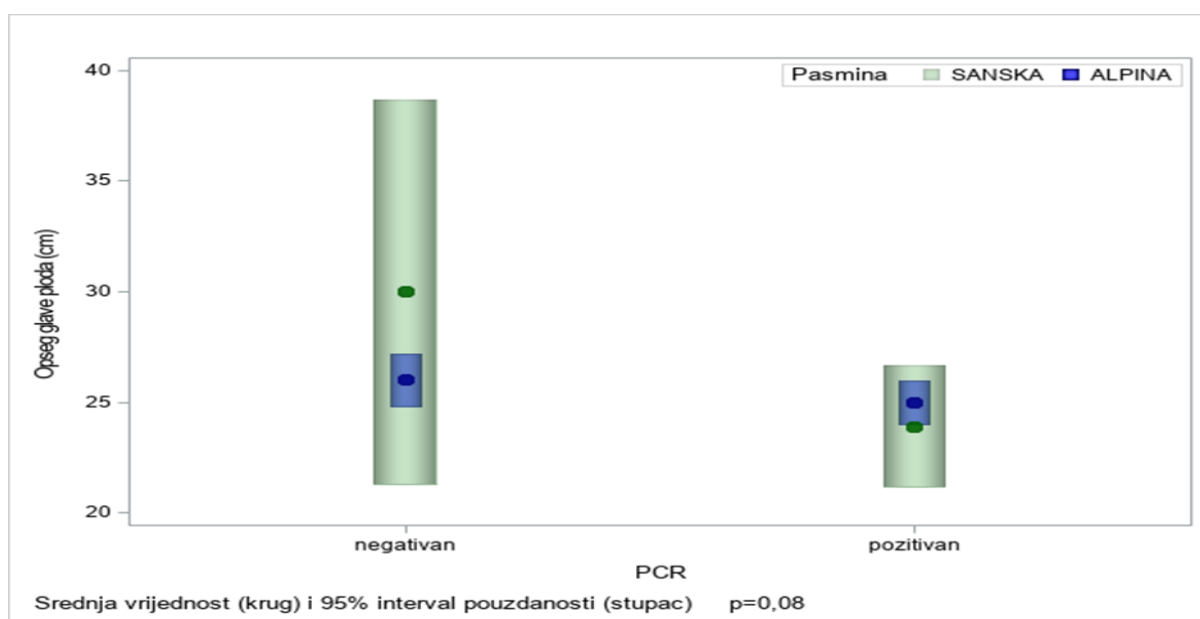
Tablica 70. Prikupljeni podaci mjera vanjštine jaradi po porodu i porođajna masa, sa razlikama između farmi.

Parametar	Ukupno							Varijacije između farmi			
	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)
Opseg glave ploda (cm)	77	25,57	3,34	19,0-38,0	13,1	26	23,0-28,0	24,0-26,4	1,0-2,0	2,76-3,72	11,2-15,5
Opseg prsa ploda (cm)	77	35,33	3,61	26,0-49,0	10,2	36	34,0-38,0	32,3-36,6	33,0-37,0	2,87-3,56	5,52-5,57
Dužina ploda (cm)	77	55,42	3,13	50,0-62,0	5,6	55	53,0-57,0	55,00-55,64	55,0-55,0	3,03-3,19	5,52-5,77
Porođajna masa (kg)	76	4,17	0,7	2,00-5,26	16,8	4,14	3,80-4,77	3,53-4,49	3,60-4,41	0,48-0,70	10,77-19,82

Statističkom analizom porođajnih mjera nije ustanovljen statistički značajan utjecaj rezultata PCR pretrage skupnih uzoraka obriska sluznica (tablica 71). Među tjelesnim mjerama tendenciju je pokazivao ($p=0,08$) opseg glave. On u PCR pozitivnih koza iznosio 24,74 cm, a u PCR negativnih 26,17 cm.

Tablica 71. Prikupljeni podaci mjere vanjštine jaradi, broja jaradi, porođajne mase i mase pri odbiću razvrstani prema vrsti kozjeg herpesirusa.

Parametar	PCR	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Broj jaradi	+	87	1,44	0,5	1,0-2,0	34,53	1	1,00-2,00
	-	53	1,73	0,94	1,0-4,0	54,36	1	1,00-2,00
Opseg glave ploda (cm)	+	52	24,74	3,83	19,00-40,00	15,19	25	22,0-28,0
	-	28	26,17	3,34	21,00-38,00	12,64	26	24,0-28,5
Opseg prsa ploda (cm)	+	52	35,44	4,69	26,00-53,00	13,23	35	33,0-38,0
	-	28	35,35	2,85	28,00-41,00	8,08	36	34,0-37,0
Dužina ploda (cm)	+	52	54,65	2,87	50,00-61,00	5,26	54,5	52,0-56,0
	-	28	55,89	3,53	51,00-62,00	6,31	55,5	53,0-59,0
Porođajna masa (kg)	+	97	4,2	0,73	2,00-5,26	17,6	4,2	3,80-4,90
	-	59	4	0,79	2,11-5,26	19,75	4,12	3,50-4,52
Masa pri odbiću (kg)	+	97	8,64	2,21	5,42-14,50	25,61	7,55	6,98-10,05
	-	52	8,26	71,95	5,94-15,00	23,7	7,33	6,97-9,25



Slika 19. Grafikon Prikaz opsega glave ploda u odnosu na rezultat PCR pretrage i pasminu.

Zanimljivo, jarad koza koje su dale pozitivan rezultat PCR pretrage obriska sluznice nosa imala su veću porođajnu masu ($p=0,006$) (tablica 72).

Tablica 72. Tjelesne mjere jaradi zajedno s porođajnom masom analizirane u odnosu na rezultat PCR pretrage, mjesto izlučivanja virusa i prisutnost uzročnika u mlijeku.

DOKAZ VIRUSA		Opseg glave jareta (cm)		Opseg prsa jareta (cm)		Dužina jareta (cm)		Porođajna tjelesna masa jareta (kg)	
		Srednja vrijednost $\pm$ S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost $\pm$ S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost $\pm$ S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost $\pm$ S.E.M.	p vrijednost
PCR	+	24,74 $\pm$ 0,51	0,08	35,37 $\pm$ 0,58	0,91	54,62 $\pm$ 0,43	0,08	4,19 $\pm$ 0,07	0,15
	-	26,17 $\pm$ 0,68		35,48 $\pm$ 0,77		55,89 $\pm$ 0,57		4,01 $\pm$ 0,09	
BRIS NOSA	+	25,69 $\pm$ 0,62	0,96	36,16 $\pm$ 0,68	0,13	54,94 $\pm$ 0,53	0,73	4,30 $\pm$ 0,08	0,006
	-	25,65 $\pm$ 0,57		34,74 $\pm$ 0,62		55,18 $\pm$ 0,48		3,96 $\pm$ 0,08	
BRIS STIDNICE	+	25,15 $\pm$ 0,60	0,24	35,47 $\pm$ 0,67	0,86	54,76 $\pm$ 0,51	0,40	4,15 $\pm$ 0,09	0,68
	-	26,14 $\pm$ 0,58		35,31 $\pm$ 0,65		55,36 $\pm$ 0,49		4,10 $\pm$ 0,08	
MLIJEKO	+	24,47 $\pm$ 0,81	0,10	34,28 $\pm$ 0,89	0,11	55,71 $\pm$ 0,68	0,28	4,07 $\pm$ 0,12	0,71
	-	26,05 $\pm$ 0,49		35,96 $\pm$ 0,54		54,83 $\pm$ 0,41		4,12 $\pm$ 0,07	

Porođajne mjere jaradi, ovisno o vrsti herpesvirusa dokazanog kod majke, te broj ojarane jaradi i mase pri odbiću prikazane su tablično (tablica 73).

Tablica 73. Prikupljeni podaci mjere vanjštine jaradi, broja jaradi, porođajne mase i mase pri odbiću razvrstani prema vrsti kozjeg herpesirusa.

Parametar	Virus	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Koeficijent varijacije (%)	Medijan	Donji i gornji kvartil
Broj jaradi	Negativno	53	1,73	0,94	1,0-4,0	54,36	1	1,0-2,0
	CpHV-2	60	1,4	0,49	1,0-2,0	35,28	1	1,0-2,0
	CpLHV	25	1,6	0,5	1,0-2,0	31,25	2	1,0-2,0
Opseg glave ploda (cm)	Negativno	28	26,5	3,34	21,00-38,00	12,64	26	24,0-28,5
	CpHV-2	31	25,74	4,11	20,00-40,00	15,98	26	23,0-29,0
	CpLHV	21	24,47	3,32	19,00-30,00	13,58	23	22,0-28,0
Opseg prsa ploda (cm)	Negativno	28	35,35	2,85	28,00-41,00	8,08	36	34,0-37,0
	CpHV-2	31	35,35	4,84	26,00-53,00	13,69	34	33,0-38,0
	CpLHV	21	35,57	4,57	29,00-49,00	12,86	35	33,0-38,0
Dužina ploda (cm)	Negativno	28	55,89	3,53	51,00-62,00	6,31	55,5	53,0-59,0
	CpHV-2	31	54,61	2,9	50,00-61,00	5,32	54	52,0-56,0
	CpLHV	21	54,71	2,9	50,00-61,00	5,3	55	52,0-57,0
Porođajna masa (kg)	Negativno	59	4	0,79	2,11-5,26	19,75	4,12	3,50-4,52
	CpHV-2	60	4,31	0,65	2,87-5,26	15,17	4,26	3,98-4,93
	CpLHV	35	3,96	0,83	2,00-5,19	21,02	4	3,60-4,70
Odbiće (kg)	Negativno	52	8,26	1,95	5,94-15,00	23,7	7,33	6,97-9,25
	CpHV-2	51	8,47	2,22	5,42-14,50	26,22	7,31	6,98-10,50
	CpLHV	19	9,13	2,27	6,21-13,00	24,88	9,5	6,98-11,00

Statističkom analizom ustanovljeno je da je opseg glave jaradi u negativnih koza statistički značajno veći od koza inficiranih s CpLHV (tablica 74). Porođajna masa jaradi koza inficiranih s CpHV-2 je statistički značajno veća od mase jaradi negativnih koza i koza inficiranih CpLHV (tablica 74). U istoj tablici se vidi i da koze inficirane CpHV-2 jare statistički značajno manje jaradi od negativnih koza.

Tablica 74. Utjecaj vrste virusa na mjere vanjštine jaradi, prodajnu masu i masu po odbiću, prirast, broj jaradi i na trajanje gravidnosti.

DOKAZ VIRUSA		Opseg glave (cm)	Opseg prsa (cm)	Porodajna dužina (cm)	Porodajna tjelesna masa (kg)
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.
VIRUS	Negativno	26,50±0,69 ^A	35,35±0,78	55,89±0,59	4,00±0,09 ^B
	CpHV-2	25,74±0,65 ^{AB}	35,35±0,74	54,61±0,56	4,31±0,09 ^A
	CpLHV	24,47±0,71 ^B	35,57±0,91	54,71±0,68	3,99±0,12 ^B
VRSTA VIRUSA		Tjelesna masa pri odbiću (kg)	Prirast od poroda do odbića (kg)	Broj jaradi	Trajanje gravidnosti (dani)
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.
VIRUS	Negativno	8,26±0,29	4,22±0,31	1,73±0,09 ^A	148,9±0,8
	CpHV-2	8,47±0,29	4,05±0,31	1,40±0,09 ^B	148,3±0,8
	CpLHV	9,13±0,48	4,92±0,51	1,60±0,14 ^{AB}	151,2±1,23

Različite slovne oznake označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između vrste virusa

Vrsta virusa nije utjecala na brzinu prirasta jaradi do odbića, neovisno o spolu (tablica 75).

Tablica 75. Utjecaj vrste virusa na prirast jaradi odvojen po spolu

Parametar		Prirast ženske jaradi od poroda do odbića (kg)	Prirast muške jaradi od poroda do odbića (kg)
Virus	Negativno	3,48±0,25	6,68±0,69
	CpHV-2	3,41±0,26	5,46±0,60
	CpLHV	3,29±0,50	6,73±0,80

Kada su promatrane koze tijekom razdoblja najveće reproduktivne sposobnosti (starosti od dvije do sedam godina) i one koje nisu u njemu, ustanovljeno je da rezultat PCR pretrage skupnog uzorka obrisaka sluznice nije imao značajan utjecaj na broj jaradi,

njihovu porođajnu masu, masu pri odbiću i prirast (tablica 76). Kada je promatran utjecaj dokazanog virusa u majke, životinje između dvije i sedam godina, a koje su inficirane CpLHV rađale su jarad manje porođajne mase od koza inficiranih CpHV-2 (tablica 76).

Tablica 76. Koze razvrstane u dvije dobne kategorije i razlike između promatranih parametara vezanih uz jarad, u odnosu na rezultat PCR pretrage i vrstu virusa.

Parametar			Porođajna tjelesna masa jareta (kg)		Tjelesna masa po odbiću jareta (kg)		Prirast jareta od poroda do odbića (kg)		Broj jaradi	
			Srednj		Srednj		Srednj		Srednj	
			a	p	a	p	a	p	a	p
			vrijedn ost ± S.E.M.	vrijedn ost	vrijedn ost ± S.E.M.	vrijedn ost	vrijedn ost ± S.E.M.	vrijedn ost	vrijedn ost ± S.E.M.	vrijedn ost
Dob koze	< 2 g i > 7 g		4,39±0,21		8,19±0,61		3,81±0,63		1,08±0,16	
	=> 2 g =< 7 g		4,14±0,07	n.s.	8,43±0,23	n.s.	4,12±0,24	n.s.	1,36±0,06	0,1
Dob koze *	< 2 g > 7 g	+	4,37±0,20		8,47±0,59		4,14±0,62		1,16±0,06	
		-	4,42±0,36	n.s.	7,90±1,06	n.s.	3,48±1,11	n.s.	1,00±0,27	n.s.
PCR	=>2 g =<7 g	+	4,19±0,09		8,65±0,31		4,21±0,36		1,29±0,07	
		-	4,10±0,11	n.s.	8,21±0,34	n.s.	4,04±0,36	n.s.	1,44±0,09	n.s.
Dob koze * virus	< 2 g > 7 g	Negativno	4,42±0,36	A	7,90±1,07	A	3,48±1,11	A	1,00±0,35	A
		CpHV-2	4,35±0,22	A	8,41±0,66	A	4,08±0,69	A	1,10±0,15	A
		CpLHV	4,44±0,40	A	8,73±1,37	A	4,44±1,45	A	1,50±0,35	A
	=> 2g =<7 g	Negativno	4,09±0,11	AB	8,22±0,38	A	4,06±0,37	A	1,44±0,08	A
		CpHV-2	4,35±0,11	A	8,38±0,36	A	3,90±0,38	A	1,28±0,08	A
		CpLHV	3,88±0,14	B	9,39±0,62	A	5,09±0,65	A	1,40±0,13	A

Jarčevi koji su imali pozitivan rezultat PCR pretrage skupnog uzorka obrisaka sluznice dobivali su jarad s tjelesnom masom većom pri odbiću od negativnih ($p=0,005$), kao i jarad sa statistički značajno većim prirastom ($p=0,007$).

Tablica 77. Analiza PCR rezultata jarčeva s obzirom na parametre vezane uz jarad.

DOKAZ VIRUSA JARČEVI		Opseg glave jareta (cm)		Opseg prsa jareta (cm)		Dužina jareta (cm)		Porodajna tjelesna masa jareta (kg)	
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost
PCR	+	25,86±0,57	0,46	34,83±0,59	0,36	54,58±0,48	0,12	4,09±0,08	0,06
	-	25,23±0,72		35,64±0,66		55,70±0,54		4,34±0,10	
DOKAZ VIRUSA JARČEVI		Tjelesna masa po odbiću jareta (kg)		Prirast jareta od poroda do odbića (kg)		Broj jaradi		Trajanje gravidnosti (dani)	
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost	Srednja vrijednost ± S.E.M.	p vrijednost
PCR	+	8,81±0,28	0,005	4,44±0,30	0,007	1,40±0,07	0,8	149,8±1,2	0,17
	-	7,60±0,31		3,22±0,33		1,38±0,06		147,3±1,3	

5.6.3. Rezultati fetometrije

Iako je u početnom planu istraživanja bilo predviđeno uzimanje fetometrijskih mjera, zbog straha vlasnika da će koze pobaciti prilikom manipulacije to je bilo onemogućeno odnosno uzete su mjere za premalen broj životinja za statističku obradu.

5.7. Dokaz herpesvirusa u mlijeku i utjecaj infekcije na mliječnost

PCR metodom pretraženo je 184 dostupnih uzoraka kozjeg mlijeka neposredno nakon jarenja (kolostrum) i tijekom laktacije, te je za šest uzoraka dobiven slijed nukleotida. Od ukupnog broja pretraženih uzoraka 25,54% je bilo pozitivno (Tablica 78). U 17 uzoraka mlijeka dokazan je DNK herpesvirusa iako je skupni uzorak obriska sluznice nosa i stidnice bio negativan. Određivanjem nukleotidnog slijeda u mlijeku je dokazana prisutnost i CpHV-2 i CpLHV.

Tablica 78. Rezultati pretrage mlijeka PCR metodom

Rezultat PCR	N	Postotak (%)
Negativno	137	74,46
Pozitivno	47	25,54
Ukpno	184	100

Izlučivanje herpesvirusa nije se razlikovalo između kolostruma i mlijeka (tablica 79), međutim izlučivanje herpesvirusa je značajno ovisilo o farmi na kojoj su koze držane ($p=0,0073$) (tablica 80).

Tablica 79. Udio negativnih i pozitivnih koza iz uzorka mlijeka prema razdoblju uzorkovanja.

Mlijeko	Uzorkovanje		P-vrijednost
	Kolostrum	Mlijeko	0,5135
Negativno	86 (72,88 %)	51 (77,27 %)	
Pozitivno	32 (27,12 %)	15 (22,73 %)	
Ukupno uzorkovano koza	118	66	

Tablica 80. Udio pozitivnih i negativnih iz uzoraka mlijeka pretraženih PCR pretragom prema farmama.

Broj farme	Mlijeko		P-vrijednost
	Pozitivno	Negativno	
1	30 (20,97 %)	113 (79,03 %)	0,0073
2	6 (31,57 %)	13 (68,43 %)	
3	5 (45,45 %)	6 (54,54 %)	
4	6 (54,54 %)	5 (45,45 %)	

Za analizu utjecaja herpesvirusnih infekcija na mliječnost prikupljeni su podaci o količini mlijeka neposredno nakon poroda i tijekom zadnje trećine laktacije, zatim postotak mliječne masti, bjelančevina, šećera, urea u 100 ml i broj somatskih stanica.

Iz tablice 81 razvidno je da količina proizvedenog kolostruma u životinja kod kojih je u skupnom uzorku obrisaka sluznica dokazana herpesvirusna DNK značajno manja od koza kod kojih nije. Također, statistički značajno je manja proizvodnja kolostruma i količina mlijeka tijekom laktacije u CpLHV inficiranih koza.

Tablica 81. Pojedini parametri analize mlijeka u odnosu na PCR pretragu i vrstu herpesvirusa.

		Laktacija (mL)	Kolostrum (mL)	Masti (%)	Bjelančevine (%)	Šećer (%)	Urea (mg/100 mL)	Broj somatskih stanica (* 1000)
		Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.	Srednja vrijednost ± S.E.M.
PCR	Pozitivno	3196,9±6,8***	4001,9±75,7*	2,78±0,07**	3,12±0,03	4,44±0,02	37,41±0,68	1381±356
	Negativno	3214,4±8,1***	4311,3±87,4*	3,02±0,09**	3,06±0,04	4,48±0,03	36,14±0,79	1322±416
VIRUS	Negativno	3214,4±8,1 ^A	4311,3±88,1 ^A	3,02±0,09	3,06±0,04	4,48±0,03	36,14±0,80	1322±421
	CpHV-2	3189,7±8,1 ^B	3971,7±91,5 ^B	2,80±0,09	3,14±0,04	4,44±0,03	37,36±0,82	1468±433
	CpLHV	3215,6±13,3 ^{AB}	4051,2±146,4 ^{AB}	2,76±0,14	3,08±0,07	4,43±0,05	37,61±1,30	1280±683

* p<0,05; ** P=0,05; *** P=0,10; Različite slovne oznake označavaju statistički značajnu razliku između skupine virusa

6. RASPRAVA

6.1. Pojavnost i proširenost herpesvirusnih infekcija u populaciji koza

Porodica herpesvirusa je izrazito velika i raznolika. Jedna od značajki ove skupine virusa je izazivanje infekcija žlijezdanog, živčanog i reproduktivnog sustava različitih vrsta životinja. Na ovaj način herpesvirusne infekcije mogu izazvati značajne materijalne štete u stočarstvu jer osim izravnih šteta, koje nastaju zbog bolesti i uginuća oboljele životinje te troškova liječenja i prevencije, štete nastaju i zbog uzgojnih gubitaka. U velikog broja farmских životinja značaj herpesvirusnih infekcija je dobro poznat te su uvršteni u skupinu značajnih patogena (zarazni rinotraheitis goveda, pseudorabies u svinja, rinopneumonitis u konja itd.). Po drugoj strani, podaci u dostupnoj literaturi o herpesvirusnim infekcijama koza su ograničeni.

Istraživanje za potrebe ovog rada je pokazalo da su herpesvirusne infekcije intenzivno držanih koza izrazito česte. Molekularne metode dokazale su prisutnost herpesvirusne DNK u 63,51% koza, što je izrazito veliki broj. Kada je ovaj podatak promatran na razini farme, udio inficiranih životinja prelazio je i 80% na pojedinim farmama. Najzastupljeniji herpesvirus na promatranim farmama bio je CpHV-2 s prevalencijom od 38,26% te CpLHV s prevalencijom od 23,04%. Najmanju prevalenciju, od 3,87%, imao je CpHV-1. U slučaju CpHV-1 dokaz virusne infekcije je bio posredan, jer DNK nije dokazana niti u jednom obrisku od 233 životinje uključene u istraživanje, već su dokazana protutijela. Kako CpHV-1, kao i veliki broj drugih herpesvirusa, uspostavlja doživotnu latenciju dokaz protutijela je i dokaz uzročnika u predmetnoj životinji. Zanimljivo CpHV-1 infekcije zabilježene su samo na jednoj promatranoj farmi dok su druga dva opisana herpesvirusa nađena na svim. Niska seroprevalencija CpHV-1 te pojava samo na jednoj farmi u suprotnosti je s podacima iz drugih država Mediterana gdje se, kako je ranije navedeno, prevalencija kretala između 20 i 60%. Navedena činjenica bi mogla ukazati na lokalne značajke, na razini države, u epizootiologiji infekcija ovim virusom.

U prilog lokalnim čimbenicima koji utječu na epizootiologiju herpesvirusnih infekcija u koza govori i prevalencija druga dva herpesvirusa opisana u ovom istraživanju. Prevalencija CpHV-2 (38,26%) i CpLHV (23,04%) bila je značajno veća u ovom istraživanju nego što je to autorica MATIJEVIĆ, 2022. opisala na području grada Gline

u Sisačko-moslavačkoj županiji gdje je prevalencija bila 9,8 odnosno 11,6%. I u tom istraživanju korištena je ista metodologija te su podaci direktno usporedivi. Razlozi za ovakvu diskrepanciju u rezultatima mogu biti posljedica lokalnih čimbenika koji djeluju na epizootiologiju infekcija s ova dva uzročnika, promatrane farme su bile iz drugih županija, ili posljedica razlike u načinu držanja te tehnologiji uzgoja i proizvodnje na ovim farmama koza. Dok se o lokalnim čimbenicima može spekulirati ovo istraživanje je neposredno pokazalo da se prisutnost herpesvirusnih infekcija značajno razlikuje od farme do farme. Štoviše i prevalencija CpHV-2 i CpLHV se značajno razlikovala od farme do farme.

Utjecaj farme na prevalenciju pojedinih herpesvirusa je moguće objasniti i kroz različitu razinu stresa kojoj se koze izložene, a ovisno o uvjetima, držanja, hranidbe i slično. Za herpesviruse u ostalih vrsta životinja poznato je da nakon infekcije, neovisno o kliničkim znakovima, životinje ostaju trajno latentno inficirane, a do reaktivacije dolazi u stanjima vezanima za stres, uključujući gravidnost (MIYOSHI i sur., 1999.; GREENE i CARMICHEL, 2006.), ali i početak spolnog ciklusa, tj. proestrus i estrus (POSTE i KING, 1971.). Da bi se ispitaio utjecaj stresa na izlučivanje virusa uzorkovanje je provedeno tijekom dva razdoblja, tijekom prve trećine graviditeta i u ranom puerperiju. Pri uzorkovanju u ranoj fazi graviditeta bilo pozitivno 65,71 % koza, dok je tijekom puerperija bilo pozitivno njih 58,43 %. Tijekom rane faze graviditeta 47,12 % životinja imalo je pozitivan bris sluznice nosa, dok je njih 41,35 % imalo pozitivan bris sluznice stidnice. Tijekom puerperija, bris sluznice nosa bio je pozitivan u 43,75 % koza, dok bris sluznice stidnice bio pozitivan u 44,38 % pretraženih uzoraka. Nije bilo statistički značajne razlike u izlučivanju opisanih virusa neovisno o vremenu uzorkovanja. Iako nije dokazan utjecaj poroda, kao stresnog događaja, na izlučivanje herpesvirusa dodatno istraživanje koje bi uključilo više različitih stresora moglo bi dati konačni odgovor.

Kako je ovo istraživanje obuhvatilo svega četiri farme mliječnih koza s vrlo sličnim uvjetima držanja, mogućnost identifikacije pojedinačnih čimbenika rizika bila je ograničena, ali se pokazalo da je pasmina držanih koza značajna. Koze sanske pasmine su značajno češće bile inficirane herpesvirusima od alpina koza. Međutim i ovdje se vidio utjecaj uvjeta držanja i uzgoja jer dok se prevalencija pojedinih vrsta herpesvirusa nije razlikovala između farmi koje su držale sanske koze, kod farmi koje drže alpine ta je razlika bila značajna.

Svi dobiveni podaci o proširenosti i epizootiologiji su izrazito značajni jer ovih podataka o kozjim herpesvirusima u znanstvenoj literaturi gotovo da i nema. Osim ograničenih podataka o CpHV-1, način izlučivanja CpHV-2 i CpLHV je praktički nepoznat. U ovom istraživanju je pokazano da se oba virusa izlučuju putem sluznice nosa te sluznice vagine i prepucija. Ovo je u skladu s istraživanjem MATIJEVIĆ, 2022. Po drugoj strani, ovo istraživanje je pokazalo i razlike između dva navedena virusa. CpHV-2 se češće izlučuje preko sluznice nosa, dok je u slučaju CpLHV to češće sluznica stidnice odnosno prepucija. Navedena razlika može značajno utjecati na načine širenja svakog od ova dva uzročnika, ali to je potrebno dodatno ispitati. Osim na sluznicama, prisutnost CpHV-2 i CpLHV dokazana je i u kolostrumu i mlijeku. Izlučivanje virusa mlijekom također se razlikovalo između promatranih farmi. Ovim putem moguća je infekcija jaradi u najranijoj dobi, ukoliko to nije onemogućeno zbog kolostralne imunosti. Nažalost, unatoč planiranom uzorkovanju jaradi u prvim mjesecima života te pokušaju dokaza ranih infekcija, to u ovom istraživanju nije bilo moguće. Zbog zabrinutosti, vlasnici su odbili uzorkovanje jaradi.

6.2. Kliničko očitovanje infekcije koza herpesvirusima

Vrlo je malo poznato o kliničkim znakovima infekcije herpesvirusima u koza. Najviše je podataka dostupno za infekcije CpHV-1. Ovaj uzročnik većinom uzrokuje subkliničke infekcije, osobito u odraslih, ali su opisani slučajevi vulvovaginitisa, balanopostitisa, a u mladunčadi i respiratorne poremetnje, vrućica i leukopenija (GREVAL i WELLS, 1986.; TEMPESTA i sur., 1999b.; PIPER i sur., 2008;). Infekcije drugim herpesvirusima, koji mogu zaraziti koze, opisani su većinom kao slučajevi maligne kataralne groznice u drugih prijemljivih vrsta, ne koza, što daje na značaju ovom istraživanju.

Kako bi se ustanovila klinička slika infekcije herpesvirusima koza, životinje u ovom istraživanju klinički su pregledane. Klinički pregled bio je usmjeren na promjene na vidljivim sluznicama, pojavu iscjetka, promjenama na limfnim čvorovima, procjeni tjelesne kondicije, promjeni u tjelesnoj temperaturi, pojavi apscesa te promjenama u krvnoj slici.

Poznato je da herpesvirusi u domaćina izazivaju erozije po sluznici te zažarenost kao dio općeg infekcijskog sindroma (CVETNIĆ, 1997). Prilikom pregleda promatrala se

sluznica usne šupljine, konjunktiva i sluznica stidnice te prepucija. Iako su opisane erozije i zažarenost nije dokazana poveznica njihove pojave s herpesvirusnim infekcijama općenito, niti infekcijom CpHV-2 ili CpLHV. Slično, niti promjene na limfnim čvorovima, vimenu, niti tjelesna temperatura nisu bile povezane s infekcijom CpHV-2 odnosno CpLHV. Navedeni rezultati bili su očekivani. Možemo pretpostaviti da je klinička slika jače izražena u akutnim slučajevima bolesti, dok je zbog plana ovog istraživanja akutne slučajeve bilo nemoguće izolirano ispitati. Opisivanje akutnih slučajeva vjerojatno bi bilo moguće prilikom promatranja infekcije u jaradi, ali zbog ranije spomenute zabrinutosti vlasnika to u ovom slučaju nije bilo moguće.

Po drugoj strani laboratorijske pretrage periferne krvi pokazale su značajne promjene u koza inficiranih herpesvirusima. Kako je vidljivo iz rezultata ovog istraživanja broj limfocita je manji u koza inficiranih herpesvirusima. Nadalje, broj limfocita u perifernoj krvi je značajno manji u koza s potvrđenom infekcijom virusom CpLHV. Od ranije je poznato da herpesvirusi utječu na broj i funkciju limfocita (CARTER i sur., 1989.). Ova značajka herpesvirusnih infekcija je posebno ispitivana u goveda oboljelim od zarazne leukoze goveda, a koja su razvila limfom. Leukoza goveda je lentivirusna infekcija koja je po pravilu subklinička, međutim u životinja s klinički manifestnom infekcijom dokazana je povećana učestalost infekcija BLHV (ROVNAK i sur. 1998.). Upravo iz ovog razloga te zbog mogućnosti uzgoja u staničnim kulturama goveđih B limfocita ovaj se virus i naziva limfotropnim. Kada je CpLHV prvi puta opisan, zbog sličnosti u aminokiselinskom slijedu s BLHV nazvan je kozjim limfotropnim herpesvirusom (LI i sur., 2001.). Upravo ovo istraživanje ukazuje da je sličnost ova dva virusa možda i veća nego što se u prvu ruku činilo.

Utjecaj CpLHV infekcije na broj limfocita u perifernoj krvi može imati veliki značaj upravo zbog njihove centralne uloge u imunosnom odgovoru. Daljnja istraživanja bi trebala dati odgovor da li CpLHV virus selektivno smanjuje broj svih limfocita ili određene subpopulacije. Isto tako dati odgovor jesu li koze zaražene ovim virusom imunosuprimirane i kao takve podložnije infekciji drugim uzročnicima. Upravo iz tog razloga koze uključene u istraživanje bile su pretražene na prisutnost protutijela za virus artritisa-encefalitisa koza te imaju li koze inficirane herpesvirusima kraći životni vijek. Artritis-encefalitis koza je doživotna lentivirusna infekcija koja je zbog svoje visoke prevalencije svrstana među najvažnije virusne zarazne bolesti koza (LEITNER i sur.,

2010.). Istraživanja artritis encefalitis koza na području RH pokazuju seroprevalenciju od 53.72 % (TARIBA i sur., 2017.) i u razdoblju od 2012-2019 od 40,62 % (VINCEK i sur., 2020.). U ovom istraživanju dobiveni je 175 pozitivnih i 36 negativna seruma pretraženih ELISA-om, odnosno seroprevalenciju artritis-encefalitisa koza je iznosila visokih 82,94 %. Iako je veliki broj koza inficiran ovim virusom, svega 30% životinja razvije kliničku sliku bolesti. Klinička slika se očituje kao artritis, encefalitis, promjene u konzistenciji vimena te drugi sindromima (PHELPS i SMITH, 1993.). U ovom istraživanju je pokazano da koze inficirane ovim virusom imaju značajno manji broj leukocita, međutim nije dokazan utjecaj na druge hematološke parametre, promjene na vimenu i druge praćene kliničke znakove. Po drugoj strani nije dokazano da infekcije herpesvirusima predisponiraju koze na infekciju virusom artritisa-encefalitisa koza i obrnuto. Isto tako budući da je od uzorkovanja do obrade podataka prošlo više od dvije godine, bilo je moguće utvrditi utjecaj infekcije na zabilježena uginuća. Statističkom obradom nije utvrđen značajan utjecaj infekcija herpesvirusima ili CpHV-2 odnosno CpLHV na životni vijek koza.

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na razlike između procjene tjelesne kondicije između farmi. Brojni su čimbenici koji utječu na tjelesnu kondiciju u koza, a među najvažnijima su hranidba, parazitarne, virusne ili bakterijske i metaboličke bolesti. kao i faza u produkciji, pri čemu su optimalne vrijednosti tijekom parenja, graviditeta i jarenja između 3,0 i 3,5, u laktaciji 2,5-3,0, dok se za vrijednosti između 1,0-2,0 smatra da pokazuju na mogući problem (GHOSH i sur., 2019.). Nedostatak znanja o pravilnim uvjetima u različitim fiziološkim stanjima dovodi do smanjene plodnosti, povećanja stope infekcije ili infestacije parazitima, smanjenja proizvodnje mlijeka i povećanja troškova hrane. Stoga, koze treba održavati u umjerenom željenom tjelesnom stanju. Kada se ukupni BCS u stadu drastično smanji, to znači da farma treba odgovarajuće mjere kao što su dehelmintizacija, prilagođena prehrana, cijepljenje protiv zaraznih bolesti, kvalitetnija paša i rotacija pašnjaka. S druge strane, kada ukupno tjelesno stanje stada počne rasti, to je znak da uzgajivač treba smanjiti dodatno hranjenje. (GHOSH i sur., 2019.). Navedeno ukazuje na utjecaj farme, jer nije bilo razlike između pozitivnih i negativnih životinja, te između dokazanih vrsta kozjih herpesvirusa pri procjeni tjelesne kondicije.

6.3. Pokazatelji reproduktivne učinkovitosti

Kliničko očitovanje infekcije u gravidnih životinja obuhvaća i njen utjecaj na parametre reproduktivne učinkovitosti. Kao pokazatelji reproduktivne učinkovitosti uobičajeno se koristi nekoliko parametara, a najčešći su to preganjanje, stopa koncepcije, stopa pobačaja, dob pri jarenju, broj ožarene jaradi i stopa mrtvorodenja. Dokaz izlučivanja herpesvirusa, dokazom herpesvirusne DNK na sluznicama, nije imao jasan utjecaj na preganjanje, stopu koncepcije, pojavu pobačaja i mrtvorodstva i dob pri jarenju. Isto tako niti infekcija pojedinom vrstom parametra nije imala značajan utjecaj na ove parametre. Na razini tendencije, ustanovljena je povezanost infekcije CpLHV s pojavom pobačaja i mrtvorodstva. Po drugoj strani dokazan je direktan utjecaj infekcije CpHV-2 na broj ožarene jaradi. Unatoč dokazanoj infekciji, postotak gravidnih životinja u ovom istraživanju bio je visok, te se kretao oko 89%, što se podudara s ostalim istraživanjima koja su uglavnom usmjerena na razlike između načina osjemenjivanja (AGOSSOU i KOLUMAN, 2018.). Pregledom literature, za CpHV-2 i CpLHV nije opisan utjecaj na pobačaj, mrtvorodenje te veličinu legla, dok je za CpHV-1 dokazano da ima utjecaj na plod ovisno o razdoblju graviditeta u kojem koza biva inficirana. U prvoj trećini graviditeta, izaziva uginuće ploda, odnosno dolazi do rane embrionalne smrtnosti, te se plod u potpunosti resorbira. Pretpostavka je da uzrokuje luteolizu zbog koje dolazi do uginuća ploda. U kasnijim stadijima graviditeta dolazi do mrtvorodenja, no razina progesterona u serumu ostaje jednaka, te uzrok uginuća nije posve jasan (TEMPESTA i sur., 2004.). Kako infekcija CpHV-2 u ovom istraživanju nije bila povezana s većom stopom pobačaja i mrtvorodstva može se zaključiti da dolazi do poremećaja u ranom embrionalnom razvoju plodova što dovodi do smanjenog broja ožarene jaradi u koza inficiranih CpHV-2. Da bi se ispitaio utjecaj herpesvirusnih infekcija na razvoj ploda tijekom graviditeta istraživanje je trebalo uključiti i fetometriju, međutim to nije bilo moguće načiniti. Iako je vlasnicima rađena besplatna dijagnostika graviditeta i objašnjene su im prednosti rane dijagnostike graviditeta, kao i kasnijeg monitoringa, izuzeno su bili osjetljivi po pitanju primjene dijagnostičkih postupaka na gravidnim kozama i jaradi po rođenju. Navedeno je razumljivo jer svim farmama glavni izvor prihoda je upravo stoka, te nisu bili spremni riskirati, jer su upoznati s utjecajem stresa u koza pri manipulaciji i

mogućim posljedicama (SHELTON, 1978.). Prikupljeno je između 9-20 pojedinih fetometrijskih mjera, no broj i raznolikost rezultata kada se podijele u skupine bili su premaleni za statističku obradu.

6.4. Utjecaj herpesvirusnih infekcija na jarad po rođenju

Za istraživanje utjecaja herpesvirusnih infekcija na jarad po rođenju, prikupljeni su podaci o tjelesnim mjerama po porodu: opseg glave, opseg prsa, dužina jaradi, porođajna masa, masa pri odbiću, datumi jarenja i odbića. Iz ovih podataka je bilo moguće dodatno izračunati i prirast.

Porođajna masa jaradi koza inficiranih CpHV-2 bila je veća od ostalih. Iako ovaj podatak djeluje kontrainuitivno on samo potvrđuje značajnost nalaza da je broj jaradi koza inficiranih ovim virusom niži jer MELLADO i sur., (2011.) navode da veličina legla utječe na 81% varijabilnosti porođajne mase, tj. jarad u manjim leglima ima veću tjelesnu težinu od jaradi u većim leglima. Isto tako i jarad koza koje su dale pozitivan rezultat PCR pretrage obriska sluznice nosa imala su veću porođajnu masu, što se nadovezuje s rezultatima analize utjecaja vrste kozjeg herpesvirusa na jaradi, jer je porođajna masa jaradi koza u kojih je dokazan CpHV-2 imala statistički veću porođajnu težinu od negativnih i one jaradi koza u kojih je dokazan CpHLV, a ranije je navedeno da je izlučivanje CpHV-2 je učestalije preko sluznice nosa (78,4%).

Po drugoj strani podaci ovog istraživanja ukazuju da jarad koza inficiranih CpLHV imaju značajno manji opseg glave. Značaj ovog rezultata još nije potpuno jasan jer razlozi za manji opseg glave mogu biti brojni, ali svakako upućuje da bi praćenje razvoja ploda tijekom graviditeta u inficiranih koza moglo dati brojne odgovore.

Budući da su gotovo sva istraživanja vezana uz reproduktivnu uspješnost usmjerena na ženke, postavilo se pitanje utječe li infekcijski status jarca na zdravlje jaradi. Osnovu za ovakvo razmišljanje daje mogućnost infekcije koza tijekom kojitusa. PCR pozitivni jarčevi davali su jarad manje tjelesne mase, ali sa statističkom značajnosti na razini tendencije. Po drugoj strani, takva jarad je brže prirastala da bi pri odbiću imala veću masu od negativne jaradi. IBRAHIM i sur., (2022.) dokazuju da iako se muška jarad rađa

s većom tjelesnom masom, pri odbiću u dobi od šest tjedana nema razlike između tjelesne mase, tj da ženska jarad brže prirasta. Ipak, poznato je da veća porođajna masa jaradi smanjuje rizik od uginuća jaradi, stoga bilo kakav utjecaj na smanjivanje porođajne mase nije dobar, bez obzira na moguću povezanost s bržim prirastom (CHAUHAN i sur., 2019.).

Završno, na zdravlje jaradi, ali i isplativost uzgoja mliječnih pasmina koza direktno utječe količina proizvedenog kolostruma, mlijeka te zdravlje vimena. Različite bolesti mogu promijeniti konzistenciju mliječne žlijezde i dovesti do promjena na vimenu pa se tijekom kliničkog pregleda koza provodi i pregled vimena. (ARTECHE-VILLASOL i sur., 2022). U ovom istraživanju herpesvirusne infekcije nisu imala značajan utjecaj na pojavu promjena na vimenu niti promjena u konzistenciji. Naprotiv, statistički značajno se razlikovala pojavnost patoloških promjena na mliječnoj žlijezdi ovisno o promatranoj farmi. Na farmi broj dva češće je zabilježena mesnata konzistencija vimena (17,02%), ali je to bila i jedina farma od navedenih koja koristi ručnu mužnju koza. Na razini tendencije bila je i pojava mesnate konzistencije vimena u koza zaraženih s CpLHV.

Za razliku od promjena na vimenu, infekcija herpesvirusima imala je značajan utjecaj na proizvodnju kolostruma i mlijeka. Razvidno je bilo da je količina proizvedenog kolostruma, u životinja kod kojih je u obriscima sluznica dokazana herpesvirusna DNK, značajno manja od koza kod kojih nije. Također, statistički značajno je manja proizvodnja kolostruma i količina mlijeka tijekom laktacije u CpLHV inficiranih koza. Navedeni rezultati ukazuju da herpesvirusne infekcije mogu imati značajan utjecaj i na zdravlje jaradi, ali i na ekonomičnost držanja koza koje se koriste za dobivanje mlijeka. Kod koza, zbog građe posteljice, maternalna imunost se prenosi preko kolostruma u prvim satima života jaradi te svako stanje koje dovodi do smanjenja njegove proizvodnje direktno može utjecati na zdravlje jaradi. Po drugoj strani svako smanjenje proizvodnje mlijeka donosi i direktne ekonomske gubitke vlasnicima farmi mliječnih koza.

Iz svega navedenog vidljivo je da je ovo istraživanje dalo veliki broj podataka koji su sada bili potpuno nepoznati o proširenosti, epizootiologiji i značaju herpesvirusnih infekcija koza kako u Hrvatskoj tako i šire. Herpesvirusi koza, i drugih malih preživača, se proučavaju u svjetlu maligne kataralne groznice i zbog toga često ostaju nedovoljno proučeni u njihovih izvornih domaćina. Ovo istraživanje ne samo da je ukazalo da su oni

izrazito prošireni u populaciji koza u Hrvatskoj već i da postoje lokalni čimbenici koji dovode do razlika u epizootiologiji infekcija na razini države, manjeg geografskog područja, ali i farme.

Iako istraživanje nije bilo u mogućnosti opisati točnu kliničku sliku infekcija ukazalo je da pojedini herpesvirusi mogu imati učinak na opće stanje inficirane životinje te ju predisponirati na druge bolesti. Isto tako dokazalo je da herpesvirusne infekcije imaju neposredan učinak na reprodukciju koza, ali i proizvodnju mlijeka što može rezultirati ekonomskim gubicima u kozarskoj proizvodnji.

7. ZAKLJUČCI

1. Kozji herpesvirusi prisutni su na području Republike Hrvatske, a dokazane vrste su CpHV-2 i CpHLV, dok je dokazana izloženost CpHV-1 virusu.
2. Kozji herpesvirusi CpHV-2 i CpLHV izlučuju se kroz sluznicu nosa, stidnice, prepucija, ali i putem mlijeka i kolostruma. Postoji virusno specifična razlika u glavnom putu izlučivanja opisanih herpesvirusa.
3. Lokalni čimbenici, ali i čimbenici vezani uz pasminu, držanje i menadžment na farmi značajno utječu na proširenost herpesvirusa koza kao i na razlike u kliničkom nalazu.
4. Inficirane jedinke imaju smanjen broj limfocita, a, naročito pri infekciji s CpLHV, međutim unutar referentnih hematoloških vrijednosti koza.
5. Infekcija CpHV-2 utjecala je na smanjenje broja jaradi u leglu, ali je utjecala i na povećanje porođajne mase jaradi.
6. Infekcija CpHLV dovodi do pada proizvodnje kolostruma i mlijeka što može značajno utjecati na ekonomičnost držanja mliječnih pasmina koza

8. POPIS LITERATURE

AAYESHA, R., D. INGA, D. ROBERT, R. SAIF UR, A. S. MUHAMMAD, A. HAFIZ MUHAMMAD NAEEM, Y. ARFAN, B. RUQIA (2021): Molecular detection and characterization of ovine herpesvirus-2 using heminested PCR in Pakistan. J. Vet. Sci., 22, 51. [10.4142/jvs.2021.22.e51](https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e51)

ABECIA, J. A., F. FORCADA, A. GONZALEZ-BULNES (2011): Pharmaceutical control of reproduction of sheep and goats. Vet Clin Food Anim 27, 67-97. doi: [10.1016/j.cvfa.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.001)

ABECIA, J. A., F. FORCADA, A. GONZALEZ-BULNES (2012): Hormonal control of reproduction in small ruminants. Anim. Reprod. Sci., 130, 173-179. [10.1016/j.anireprosci.2012.01.011](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011)

ABU ELZEIN, E. M., F. M. HOUSAWI, A. A. GAMEEL, A. I. AL-AFALEQ, A. M., ELBASHIR (2003): Sheep-associated malignant catarrhal fever involving 3-5-weekold calves in Saudi Arabia. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 50, 53-9. [10.1046/j.1439-0450.2003.00541.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00541.x)

ACKERMANN, M. (2006): Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. Vet. Microbiol. 113, 211-222. [10.1016/j.vetmic.2005.11.008](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.008)

ADAMS, M. J., E. B. CARSTENS (2012): Ratification vote on taxonomic proposal to the International committee on taxonomy of viruses. Arch.Virol. 157, 1411-1422. [10.1007/s00705-012-1299-6](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1299-6)

ALDRIDGE, M. N., D. J. BROWN, W. S. PITCHFORD (2015): Genetic and phenotypic relationships between kid survival and birth weight in Australian meat goats. U: 21st Conference, Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics 21, 28-30. rujan, Lorne, Australia, 350-353

ALEMAYEHU, G., G. MAMO, B. ALEMU, H. DESTA, B. WIELAND (2021): Towards objective measurement of reproductive performance of traditionally managed goat flocks in the drylands of Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod. 53, 156. [10.1007/s11250-021-02556-y](https://doi.org/10.1007/s11250-021-02556-y)

- ALI, O. A. (1987): Caprine arthritis encephalitis related changes in the uterus of a goat. Vet. Rec., 121, 131-132. <https://doi.org/10.1136/vr.121.6.131>
- AMER, H. A. (2010): Ultrasonographic assessment of early pregnancy diagnosis, fetometry and sex determination in goats. Anim. Reprod. Sci, 117, 226–231. [10.1016/j.anireprosci.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.015)
- AMIRIDIS, G. S., S. CSEH (2012): Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. Anim. Reprod. Sci. 130, 152-161. [10.1016/j.anireprosci.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009)
- ANONYMOUS (2012): CFSP. Malignant catarrhal fever. Dostupno na http://www.cfsph.iastate.edu/factsheets/pdfs/malignant_catarrhal_fever.pdf/; pristupljeno 16. siječnja 2022.
- ANONYMUS (2022): Royal G.D. Annual report small ruminant health monitoring and surveillance, Nizozemska.
- ANONYMUS (2023): Godišnje izvješće za ovčarstvo, kozarstvo i male životinje za 2020. god. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. Glas Slavonije doo. <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2024/06/Ovcarstvo-kozarstvo-i-male-zivotinje-Godisnje-izvjesce-2023.pdf> pristupljeno 12. svibnja 2024.
- ASSAN, N., (2020): Determinants of birth weight and its size as an onset representative of growth potential in goat and sheep meat production. Agricultural Advances, 9, 522-536. [10.14196/aa.v9i5.645](https://doi.org/10.14196/aa.v9i5.645)
- AUFY, A. A., D. MAGISTRELLI, F. ROSI (2016): Effect of weaning and milk replacer feeding on plasma insulin and related metabolites in Saanen goat kids. Ital. J. Anim. Sci., 8, 256-258, [10.4081/IJAS.2009.S2.256](https://doi.org/10.4081/IJAS.2009.S2.256)
- BENNETT, P. R., M. P. ROSE, L. MYATT, M. G. ELDER (1987): Preterm labour: Stimulation by arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products. Am. J. Obstet. Gynecol. 156, 649-655. [10.1016/0002-9378\(87\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(87)90070-6)
- BERGONIER, D., R. DE CREMOUX, R. RUPP, G. LAGRIFFOUL, X. BERTHELOT (2003): Mastitis od dairy small ruminants. Vet. Res. 34, 689-716. [10.1051/vetres:2003030](https://doi.org/10.1051/vetres:2003030)

BERNIER GOSSELIN V., D. H. VOLKMANN, S. DUFOUR, J. R. MIDDLETON (2018): Use of ultrasonographic fetometry for the estimation of days to kidding in dairy does. *Theriogenology*, 118, 22–26. [10.1016/j.theriogenology.2018.05.041](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.041)

BORWICK, S. C., S. M. RHIND, S. R. MCMILLEN, P. A. RACEY (1997): Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 711-716. [10.1071/r97011](https://doi.org/10.1071/r97011)

BRINKHOF J. M. A., D. J. HOUWERS, C. VAN MAANEN (2007): Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Rumin. Res.* 70, 194–199. [10.1016/j.smallrumres.2006.03.003](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.03.003)

BROWNING, R., M. L. LEITE-BROWNING, T. SAHLU (1995): Factors affecting standardized milk and fat yields in Alpine goats. *Small Rumin. Res.* 18, 173–178. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00719-2](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00719-2)

BUONAVOGLIA C., M. TEMPESTA, A. CAVALLI, V. VOIGT, D. BUONAVOGLIA, A. CONSERVA, M. CORRENTE (1996): Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19, 275-281.

CAMERO, M., A. L. BELLACICCO, E. TARSITANO, N. DECARO, V. MARTELLA, M. TEMPESTA, C. BUONAVOGLIA (2007): Intravaginal administration of an inactivated vaccine prevents lesions induced by caprine herpesvirus-1 in goats. *Vaccine*, 25, 1658–1661. [10.1016/j.vaccine.2006.11.002](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.002)

CARNICELLA, D., M. DARIO, M. AYRES, V. LAUDADIO, C. DARIO (2008): The effect of diet, parity, year and number of kids on milk yield and milk composition in Maltese goat. *Small Rumin. Res.* 77, 71–74. [10.1016/j.smallrumres.2008.02.006](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.02.006)

CARTER, G. R., P. J. WISE, E. F. FLORES (2006): *Herpesviridae. U: A concise review of veterinary virology.* (Carter, G. R., D. J. Wise, E. F. Flores, urednici) Ithaca: IVIS. (www.ivis.org.)

CARTER, J. J., A. D. WEINBERG, A. POLLARD, R. REEVES, J. A. MAGNUSON, N. S. MAGNUSON (1989): Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by bovine herpesvirus 1. *J Virol.* 63, 1525-30. [10.1128/jvi.63.4.1525-1530.1989](https://doi.org/10.1128/jvi.63.4.1525-1530.1989)

CHASE, C. C. L., R. W. FULTON, D. O'TOOLE, B. GILLETTE, R. F. DALY, G. PERRY, T. CLEMENT (2017a): Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Veterinary Microbiology* 206, 69-77. [10.1016/j.vetmic.2017.03.016](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.016)

CHASE, C., K. LUTZ, E. MCKENZIE i A. TIBARY (2017b): *Blackwell's Five-minute Veterinary consult: Ruminant*. Drugo izdanje. Wiley Blackwell. Hoboken, SAD , str. 625-628.

CHEMINAU, P., B. MALPAUX, J. A. DELGADILLO, Y. GUERIN, J. P. RAVAUULT, J. THIMONIER, J. PELETIER (1992): Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 40, 157-184.

CHEMINEAU, P., J. DELGADILLO SÁNCHEZ (1994): Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins. *INRAE Prod. Anim.* 7, 315-326. [10.20870/productions-animales.1994.7.5.4177](https://doi.org/10.20870/productions-animales.1994.7.5.4177)

CHMIELEWICZ, B., M. GOLTZ, B. EHLERS (2001): Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.* 75, 87–94. [10.1016/s0168-1702\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00252-5)

CLUNE, T., A. LOCKWOOD, S. HANCOCK, A. N. THOMPSON, S. BEETSON, A. J. D. CAMPBELL, E. GLANVILLE, D. BROOKES, C. TRENGOVE, R. O'HANDLEY, G. KEARNEY, C. JACOBSON (2021): Abortion and Lamb Mortality between Pregnancy Scanning and Lamb Marking for Maiden Ewes in Southern Australia. *Animals* 12, 10. [10.3390/ani12010010](https://doi.org/10.3390/ani12010010)

CONSTABLE, P. D., K. W. HINCHCLIFF, S. H. DONE, W. GRÜNBERG (2017.): *Veterinary medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Perinatal Diseases*. 11th ed. Elsevier, St. Louis, Missouri, SAD. Str. 1830-1903.

CORTEEL, J. M. (1997): Production, storage and artificial insemination of goat semen. U: *Management of Reproduction in Sheep and Goats Symposium*, 5-8. Srpanj, Madison, Wisconsin, SAD, str. 41-57

CRAWFORD, T. B., H. LI, S. R. ROSENBERG, R. W. NORHAUSEN, M. M. GARNER (2002): Mural folliculitis and alopecia caused by infection with goat-associated

malignant catarrhal fever virus in two sika deer. J. Am. Vet. Med. Assoc. 221, 843–847.
[10.2460/javma.2002.221.843](https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.843)

CUNHA, C. W., K. L. GAILBREATH, D. O'TOOLE, D. P. KNOWLES, D. A. SCHNEIDER, S. N. WHITE, N. S. TAUS, C. J. DAVIES, W. C. DAVIS, H. LI (2012): Ovine herpesvirus 2 infection in American bison: Virus and host dynamics in the development of sheep-associated malignant catarrhal fever. Vet. Microbiol. 159, 307-319
[10.1016/j.vetmic.2012.04.021](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.021)

CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska str. 289-293.

DAUBNEY, R., J. R. HUDSON (1936): Transmission experiments with bovine malignant catarrh. J. Comp. Pathol. 49, 63-89. [10.1016/S0368-1742\(36\)80003-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(36)80003-4)

DAVISON, A. J. (2010): Herpesvirus systematics. Vet. Microbiol. 143, 52-69.
[10.1016/j.vetmic.2010.02.014](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014)

DIJKSTRA E., P. VELLEMA, R. BROM, I. SANTMAN-BERENDS (2023): Kid mortality indicators based on census data in dairy goat herds in the Netherlands, Small Rumin. Res. 226 [10.1016/j.smallrumres.2023.107042](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107042)

DISKIN, M. G., D. G. MORRIS (2008): Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. Reprod. Domest. Anim. 43, 260- 267. [10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x)

DOIZE, F., D. VAILLANCOURT, H. CARABIN, D. BÉLANGER (1997): Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurement of placentomes. Theriogenology 48, 449-60. [10.1016/s0093-691x\(97\)00254-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00254-9)

DRIANCOURT, M. A. (2001): Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology. 55, 1211-39.
[10.1016/s0093-691x\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00479-4)

DWYER, C. M., J. CONINGTON, F. CORBIERE, I. H. HOLMØY, K. MURI, R. NOWAK, J. ROOKE, J. VIPOND, J. M. GAUTIER (2015.): Invited review: Improving

neonatal survival in small ruminants: science into practice. *Animal*, 10, 449-459.
[10.1017/S1751731115001974](https://doi.org/10.1017/S1751731115001974)

EDMONDSON, M. A., C. F. SHIPLEY (2021): *Theriogenology of Sheep, Goats, and Cervids*, U: *Sheep, Goat and Cervid Medicine*. Treće izdanje (PUGH, D. G., A. N. BAIRD, M. EDMONDSON, T. PASSLER, urednici). Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, 141-207.

ERDOGAN, G. (2012): Ultrasonic assessment during pregnancy in goats - a review. *Reprod Domest Anim* 47, 157-163. [10.1111/j.1439-0531.2011.01873.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01873.x)

EVANS, A.C.O. (2003): Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. 38, 240-246. [10.1046/j.1439-0531.2003.00439.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00439.x)

EVERMANN, J. F. (1989): *Diagnosis of canine herpetic infections*. U: *Current veterinary therapy: small animal practice*. 10th ed. (Kirk, R.W., ur.), W.B. Saunders, London. str. 515- 520.

FATET, A., M. T. PELLICER-RUBIO, B. LEBOEUF (2011): Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211-219. [10.1016/j.anireprosci.2010.08.029](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.029)

FERNANDEZ, D. (2014a): *Managing Perinatal Mortality in Lambs*. Cooperative Extension Program. University of Arkansas at Pine Bluff. United States Department of Agriculture. FSA 9614. SAD.

FERNANDEZ, D. (2014b): *Managing Perinatal Mortality in Goats*. Cooperative Extension Program. University of Arkansas at Pine Bluff. United States Department of Agriculture. FSA 9615. SAD.

FLINN, T., D. O. KLEEMANN, A. M. SWINBOURNE, J. M. KELLY, A. C. WEAVER, S. K. WALKER, K. L. GATFORD, K. L. KIND, W. H. E. J. van WETTERE (2020): Neonatal lamb mortality: major risk factors and the potential ameliorative role of melatonin. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11, 107. [10.1186/s40104-020-00510-w](https://doi.org/10.1186/s40104-020-00510-w)

FORTE, I. M., P. INDOVINA, S. MONTAGNARO, A. COSTA, C. A. IANNUZZI, F. CAPONE, R. CAMERLINGO, A. M. MALFITANO, F. PENTIMALLI, G. FERRARA, M. QUINTILIANI, G. PORTELLA, A. GIORDANO, R. CIARCIA (2021): The

Oncolytic Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) Induces Apoptosis and Synergizes with Cisplatin in Mesothelioma Cell Lines: A New Potential Virotherapy Approach. *Viruses*. 13, 2458. [10.3390/v13122458](https://doi.org/10.3390/v13122458)

FRASER, S. J., P. F. NETTLETON, B. M. DUTIA, D. M. HAIG, G. C. RUSSELL (2006): Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against malignant catarrhal fever viruses in cattle serum. *Vet. Microbiol.* 116, 21-8. [10.1016/j.vetmic.2006.03.002](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.002)

FRIDLUND, C., P. HUMBLLOT, R. BAGE, L. SODERQUIST (2013): Factors affecting the accuracy of pregnancy scanning in ewes. *Vet Rec* 173, 607. [10.1136/vr.101935](https://doi.org/10.1136/vr.101935)

GAO HF, J. P. WANG, Z. X. YANG, J. R. XIE, Y. W. HE, Q. H., HONG, A. G. XIN (2022): Genetic and Pathogenic Characterisation of a Virulent Akabane Virus Isolated from Goats in Yunnan, China. *J Vet Res.* 66, 35-42. [10.2478/jvetres-2022-0007](https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0007)

GARCIA-HERNANDEZ, M. E., R. E. SARMIENTO-SILVA, L. M. VALDES-VAZQUEZ, L. COBOS-MARIN (2019): Serological evidence of caprine herpesvirus type 1 infection in goats in Mexico. *Rev. mex. de cienc. pecuarias.* 10, 506-510. [10.22319/rmcp.v10i2.4791](https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4791)

GELEZ, H., C. FABRENYS (2004): The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm. Behav.* 46, 257-271. [10.1016/j.yhbeh.2004.05.002](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.002)

GIVENS, M. D., M. S. MARLEY (2008): Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 70, 270-285. [0.1016/j.theriogenology.2008.04.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.018)

GONZÁLEZ, F. , F. CABRERA, M. BATISTA, N. RODRÍGUEZ, D. ALAMO, J. SULON, J. F. BECKERS, A. GRACIA (2004): A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. 62, 1108-15. [10.1016/j.theriogenology.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.009)

GONZALEZ-MALDONADO, J., E. A. MARTINEZ-MORENO, J. F. DOMINGUEZ-CABALLERO, C. A. HERRERA-CORREDOR, J. GALLEGOS-SANCHEZ (2021): Reproductive management of the goat. *Agro Productividad.* [10.32854/agrop.v14i8.2059](https://doi.org/10.32854/agrop.v14i8.2059)

GORDON, I. (1997): Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International. Oxfordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo, str 158-163

GORDON, I. (2017): Reproductive Technologies in Farm Animals. Controlling parturition. Drugo izdanje. CAB International. Oxfordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 230-247.

GREEN, C. E., L. E. CARMICHAEL (2006): Canine Herpesvirus infection. U: Infectious Diseases of the Dog and Cat, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, SAD, str. 48-53.

GREENWOOD, P. L. (1995): Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. Prev. Vet. Med., 22, 71–87. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00399-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(94)00399-4)

GREENWOOD, P. L., A. S. HUNT, J. W. HERMANSON, A. W. BELL (2000): Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. J. Anim. Sci. 78, 50-61. [10.2527/2000.78150x](https://doi.org/10.2527/2000.78150x)

GREGORY, L., N. C., GAETA, A. BETTINI, M. CEOL, A. TAVELLA (2020): Use of a commercial ELISA kit specific for glycoprotein E peptides to indirectly detect Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) in the state of São Paulo, Brazil. Arq. Inst. Biol 87. [10.1590/1808-1657000012020](https://doi.org/10.1590/1808-1657000012020)

GREWAL A. S., R. WELLS R. (1986): Vulvovaginitis of Goats Due to a Herpesvirus. Aust. Vet. J. 63,79–82. [10.1111/j.1751-0813.1986.tb02935.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02935.x)

GREYLING, J. (2010): Applied reproductive physiology. U: Goat science and production, (Solaiman, S. G.), Wiley-Blackwell, Iowa, SAD, str. 139-155.

GRIZELJ, J., B. ŠPOLJARIĆ, F. SANCHEZ DAVILA, S. VINCE (2022b): Reproductive Management in Goat Breeding. Zbornik sažetaka u 9th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine, 22-25 srpanj, Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 77.

GRIZELJ, J., B. ŠPOLJARIĆ, S. VINCE (2015): Reproductivni managment stada u kozarstvu i ovčarstvu – kratki pregled. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. <https://veterina.com.hr/?p=39333>.

GRIZELJ, J., B. ŽEVRNJA, M. KARADJOLE, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE (2011): Reproductivni menadžment stada u kozarstvu - kratki pregled. Zbornik predavanja u Naučni simpozij, Reprodukcijska domaćih životinja. 13-16 listopada, Divčibare, Srbija, str. 107-115.

GRIZELJ, J., M.-T. PELLICER-RUBIO, B. ŠPOLJARIĆ, F. SANCHEZ-DAVILA, S. FRERET, A. FATET, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, S. VINCE (2022a): Nonhormonal Reproductive Management in Goat Breeding. CJVDS, 3, 1048. [10.54026/CJDVS1048](https://doi.org/10.54026/CJDVS1048)

GUERCIO, A., A. GRECO, G. IANNIZZOTTO, V. DI MARCO, M. TODARO (1998): Valutazione della diffusione di anticorpi anti Herpes Virus della capra in allevamenti caprini della Sicilia. Atti SIPAOC 12, 138–42.

HAENLEIN, G. F. W. (2001): Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. J Dairy Sci. 84, 2097-2115 [10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3)

HAGE, J. J., Y. H. SCHUKKEN, T. DIJKSTRA, H. W. BARKEMA, P. H. R. van VALKENGOED, G. H. WENTINK (1998): Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. Prev. Vet. Med. 34, 97-106. [10.1016/S0167-5877\(97\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00088-3)

HAIBEL, G. K. (1988): Real-time ultrasonic fetal head measurement and gestational age in dairy goats, Theriogenology, 30, 1053-1057. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90279-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90279-8)

HAIBEL, G. K., N. R. PERKINS (1989): Real-time ultrasonic biparietal diameter of second trimester Suffolk and Finn sheep fetuses and prediction of gestational age. Theriogenology 32, 863-869. [10.1016/0093-691x\(89\)90474-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(89)90474-3)

HAIBEL, G. K., N. R. PERKINS, G. M. LIDL (1989): Breed differences in biparietal diameters of second trimester Toggenburg, Nubian and Angora goat fetuses. Theriogenology 32, 827-834. [10.1016/0093-691x\(89\)90471-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(89)90471-8)

HALES, C. N., D. J. P. BARKER (1992): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 35, 595-601. [10.1007/BF00400248](https://doi.org/10.1007/BF00400248)

HASHIMOTO, A., K. HIRAI, Y. SUZUKI, Y. FUJIMOTO (1983): Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 44, 610–614.

HAYDEN, T. J., C. R. THOMAS, I. A. FORSYTH (1979): Effect of of number of young born (litter size) on milk yield of goats: Role for placental lactogen. *J. Dairy Sci.*, 62, 53-57. [10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83201-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83201-4)

HEATH, A. M., D. G. PUGH, M. S. EDENS (2007): Urogenital surgery in goats, U: Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Youngquist, R. S., W. R. Threlfall, urednici). Saunders, Elsevier, St. Louise, Missouri, SAD, str. 524-528.

HERAK-PERKOVIĆ, V., Ž. GRABAREVIĆ, J. KOS (2012): Zarazni rinotraheitis goveda / zarazni pustularni vulvovaginitis. U: Veterinarski priručnik. 6. izdanje (S. Cvetnić, T. Wikerhauser, P. Džaja, M. Herak, Z. Stojević, urednici) Zagreb, Hrvatska, str. 2610-2611

HEUSCHELE, W. P. (1988): Malignant catarrhal fever : a review of a serious disease hazard for exotic and domestic ruminants. *Zool. Gart.* 58, 123-133.

HOLTZ, W., B. SOHNREY, M. GERLAND, M. A. DRIANCOURT (2008): Ovsynch synchronization and fixed time insemination in goats. *Theriogenology* 69, 785-792. [10.1016/j.theriogenology.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.004)

HUSSY, D., N. STAUBER, C. M. LEUTENEGGER, S. RIEDER, M. ACKERMANN (2001): Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 123-8. [10.1128/CDLI.8.1.123-128.2001](https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.123-128.2001)

JANDAL, J. M. (1996): Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 22, 177-185. [10.1016/S0921-4488\(96\)00880-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(96)00880-2)

JONES A. K., S. A. REED (2017): Benefits of ultrasound scanning during gestation in the small ruminant. *Small Rumin. Res.* 149, 163-171. [10.1016/j.smallrumres.2017.02.008](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.008)

JONES, A. K., R. E. GATELY, K. K. MCFADDEN, S. A., ZINN, K. E. GOVONI, S. A. REED (2016): Transabdominal ultrasound for detection of pregnancy, fetal and placental landmarks, and fetal age before Day 45 of gestation in the sheep. *Theriogenology* 85, 939-945 [10.1016/j.theriogenology.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.002)

- KAREN, A., P. KOVÁCS, J. F. BECKERS, O. SZENCI (2001): Pregnancy Dagnosis in Sheep: Review of the Most Practical Methods. *Acta Vet. Brno.* 70, 5-126. [10.2754/avb200170020115](https://doi.org/10.2754/avb200170020115)
- KAREN, A.M., S.M. FATTOUH, S.S. ABU-ZEID (2009): Estimation of gestational age in Egyptian native goats by ultrasonographic fetometry. *Anim Reprod Sci* 114, 167-174. [10.1016/j.anireprosci.2008.08.016](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.016)
- KARSCH, F. J., E. L. BITTMAN, D. J. FOSTER, R. L. GOODMAN, S. J. LEGAN, J. E. ROBINSON (1984): Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 40, 185-232. [10.1016/b978-0-12-571140-1.50010-4](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571140-1.50010-4)
- KEEL, M. K., J. G. PATTERSON, T. H. NOON, G. A. BRADLEY, J. K. COLLINS (2003): Caprine herpesvirus-2 in association with naturally occurring malignant catarrhal fever in captive sika deer (*Cervus Nippon*). *J. Vet. Diagn. Investig.* 15, 179–83. [10.1177/104063870301500215](https://doi.org/10.1177/104063870301500215)
- KENNAWAY, D. J., L. M. SANFORD, B. GODFREY, H. G. FRIESEN (1983): Patterns of progesterone melatonin and prolactin secretion i ewes maintained in four different photoperiods. *J. Endocrinol.* 97, 229-242.
- KENYON, P. R., H. T. BLAIR (2014): Foetal programming in sheep – Effects on production, *Small Rumin. Res.* 118, 16-30. [10.1016/j.smallrumres.2013.12.021](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.021)
- KEUSER, V., J. ESPEJO-SERRANO, F. SCHYNTS, J. P. GEORGIN, E. THIRY (2004): Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *Vet. Rec.* 154, 395–399. [10.1136/vr.154.13.395](https://doi.org/10.1136/vr.154.13.395)
- KEUSER, V., S. GOGEV, F. SCHYNTS, E. THIRY (2002): Demonstration of Generalized Infection with Caprine Herpesvirus 1 Diagnosed in an Aborted Caprine Fetus by PCR. *Vet. Res. Commun.*, 26, 221–226. [10.1023/a:1015205705149](https://doi.org/10.1023/a:1015205705149)
- KOPTOPOULOS, G., M. PAPANASTASOPOULOU, O. PAPADOPOULOS, H. LUDWIG (1988): The epizootiology of caprine herpesvirus (BHV-6) infections in goat populations in Greece. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 199–205. [10.1016/0147-9571\(88\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0147-9571(88)90038-0)

KOZARIĆ, Z. (1997): Veterinarska histologija. Naklada Karolina. Zagreb, Hrvatska str. 206-209.

KRASTEVA S, M. JARA, A. FRIAS-DE-DIEGO, G. MACHADO (2020): Nairobi Sheep Disease Virus: A Historical and Epidemiological Perspective. Front Vet Sci. 7, 419. [10.3389/fvets.2020.00419](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00419)

KRUGER, L. P., T. L. NEDAMBALE, M. M. SCHOLTZ, E. C. WEBB (2016): The effect of environmental factors and husbandry practices on stress in goats, Small Rumin. Res. 141, 1-4, [10.1016/j.smallrumres.2016.06.004](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.004)

KUMATI, O. B. (2016): Virus life cycle and the parthenogenesis of malignant catarrhal fever. Doctoral dissertation. University of Nottingham. Nottingham, Ujedinjeno Kraljevstvo.

LEBOEUF, B., J. A. DELGADILLO, E. MANFREDI, A. PIACERE, V. CLEMENT, P. MARTIN, M. T. PELLICER-RUBIO, P. BOUE, R. CREMOUX (2008): Controlling reproduction in selection schemes of dairy goats. Prod. Anim. 21, 391–402.

LEBRETON M, S. UMLAUF, C. F. DJOKO, P. DASZAK. D. S. BURKE, P. Y. KWENKAM, N. D. WOLFE (2006): Rift Valley fever in goats, Cameroon. Emerg Infect Dis. 12, 702-703. [10.3201/eid1204.051428](https://doi.org/10.3201/eid1204.051428)

LEGAN, S. J., F. J. KARSCH (1980): Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. Biol. Reprod. 23, 1061-1068.

LEHLOENYA, K. C., J. P. C. GREYLING, L. M. J. SCHWALBACH (2005): Reproductive performance of South African indigenous goats following oestrous synchronisation and AI. Small Rumin. Res. 57, 115–120. [10.1016/j.smallrumres.2004.05.004](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.05.004)

LEITNER G., O. KRIFUCKS, L. WEISBLIT, Y. LAVI, S. BERNSTEIN, U. MERIN (2010): The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. TJV 183, 328-331, [10.1016/j.tvjl.2008.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.12.001)

LEKATZ, L. A., J. S. LUTHER, J. S. CATON, K. A. VONNAHME (2013): Impacts of maternal nutritional plane on umbilical artery hemodynamics, fetal and placentome growth in sheep. Anim. Reprod. 10, 99-105

LI, H., C. W. CUNHA, N. S. TAUS, D. P. KNOWLES (2014): Malignant Catarrhal Fever: Inching Toward Understanding. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2, 209-233. [10.1146/annurev-animal-022513-114156](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114156)

LI, H., D. SHEN, D. A. JESSUP, D. P. KNOWLES, J. R. GORHAM, T. THORNE, D. O'TOOLE, T. B. CRAWFORD (1996): Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA. *J. Wildl. Dis.* 32, 437-443. [10.7589/0090-3558-32.3.437](https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.3.437)

LI, H., D. T. SHEN, D. P. KNOWLES, J. R. GORHAM, T. B. CRAWFORD (1994): Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1674-1679. [10.1128/jcm.32.7.1674-1679.1994](https://doi.org/10.1128/jcm.32.7.1674-1679.1994)

LI, H., G. KARNEY, D. O'TOOLE, T. B. CRAWFORD (2008): Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Can. Vet. J.* 49, 183.

LI, H., G. SNOWDER, D. O'TOOLE, T. B. CRAWFORD (1998): Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *J. Clin. Microbiol.* 36, 223-226. [10.1128/jcm.36.1.223-226.1998](https://doi.org/10.1128/jcm.36.1.223-226.1998)

LI, H., J. KELLER, D. P. KNOWLES, T. B. CRAWFORD (2001): Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. *J. Gen. Virol.* 82, 227-32. [10.1099/0022-1317-82-1-227](https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-227)

LLANOS-SALINAS, S. P., L. COBOS-MARÍN, E. CANDANOSA-ARANDA (2018): Immunohistochemical diagnosis of Caprine alphaherpesvirus 1 (CpHV-1) in Mexico. *Austral J. Vet. Sci.* 50, 139-142. [10.4067/S0719-81322018000300139](https://doi.org/10.4067/S0719-81322018000300139)

LUO, L., W. WANG, S. SUN (2019): Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Austral J. Anim. Sci.* 32, 1284-1295. [10.5713/ajas.19.0486](https://doi.org/10.5713/ajas.19.0486)

LYNGSET, O. (1971): Studies on reproduction in the goat. VII. Pregnancy and the development of the foetus and the foetal accessories of the goat. *Acta Vet Scand.* 12, 185-201. [10.1186/BF03547752](https://doi.org/10.1186/BF03547752)

MAGISTRELLI, D., G. POLO DIMEL, F. ROSI (2007): Endocrine and metabolic traits in goat kids around weaning. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6, 625-627, [10.4081/IJAS.2007.1S.625](https://doi.org/10.4081/IJAS.2007.1S.625)

MAKONI, G. M., C. GERSPACH, N. FISCHER, G. ROSATO, R. FABIAN, P. GREEST, A. KIPAR (2024): Malignant catarrhal fever in a goat: manifestation of virus-induced erythema multiforme. *J Vet Diagn Invest* 36, 243-247. [10.1177/10406387231224906](https://doi.org/10.1177/10406387231224906)

- MALANICHEVA, T. G., E. V. AGAFONOVA, O. Y. KUZNETSOVA (2023): Role of functional nutrition in reducing the incidence of acute respiratory infections in children. *Vopr. det. dietol. (Pediatric Nutrition)*. 21, 14–25. (In Russian). [10.20953/1727-5784-2023-1-14-25](https://doi.org/10.20953/1727-5784-2023-1-14-25)
- MANIRAKIZA, J., G. HATUNGUMUKAMA, J. DETILLEUX (2020): Genetic Parameters for Growth and Kid Survival of Indigenous Goat under Smallholding System of Burundi. *Animals*. 10, 135. [10.3390/ani10010135](https://doi.org/10.3390/ani10010135)
- MAPLETOFT, R. J., J. F. HASLER (2005): Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech.* 24, 393-403.
- MARGHATO, G., V. RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, H. QUINTAS, J. SIMÕES (2019): The effects of reproductive disorders, parity, and litter size on milk yield of Serrana goats. *Animals*, 9, 968. <https://doi.org/10.3390/ani9110968>
- MARTIN, G. B., J. T. B., MILTON, R. H. DAVIDSON, G. E. BANCHERO HUNZICKER, D. R. LINDSAY, D. BLACHE (2004): Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-246. [10.1016/j.anireprosci.2004.05.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.014)
- MATIJEVIĆ, B. (2022): Molekularna epidemiologija herpesvirusne infekcije ovaca i koza u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
- MATSAS, D. (2007): Pregnancy Diagnosis in Goats. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 547–554. [10.1016/b978-072169323-1.50075-1](https://doi.org/10.1016/b978-072169323-1.50075-1)
- MCCOARD, S. A., F. A. SALES, Q. L. SCIASCIA (2017.): Invited review: impact of specific nutrient interventions during mid-to-late gestation of physiological traits important for survival of multiple-born lambs. *Animal* 11, 1727-1736. [10.1017/S1751731117000313](https://doi.org/10.1017/S1751731117000313)
- MCCOY, M. H., D. L. MONTGOMERY, A. C. BRATANICH, J. CAVENDER, P. B. SCHARKO, M. L. VICKERS (2007): Serologic and reproductive findings after a herpesvirus-1 abortion storm in goats. *JAVMA*, 231, 1236-1239. [10.2460/javma.231.8.1236](https://doi.org/10.2460/javma.231.8.1236)

- MCGECH, D. J. (2001): Molecular evolution of the gamma-herpesvirinae. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 29, 421–435. [10.1098/rstb.2000.0775](https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775)
- MCGECH, D. J., A. J. DAVISON, A. DOLAN, D. GATHERER, E. SEVILLAREYES (2008): Molecular Evolution of the Herpesvirales. U: *Origin and evolution of viruses.* (Domingo, E., C. R. Parrish, J. J. Holland, urednici). Academic Press. Waltham, Massachusetts, SAD, str. 447-475.
- MCGECH, D. J., F. J. RIXON, A. J. DAVISON (2006): Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117, 90-104. [10.1016/j.virusres.2006.01.002](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002)
- MELLADO, M. (2016): Goat Husbandry: Reproductive Management. U: *Reference Module in Food Science.* str. 1-8 [10.1016/B978-0-08-100596-5.00823-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00823-4)
- MELLADO, M., L. M. LARA, J. E. GARCIA (2004): Risk factors involved in conception, abortion, and kidding rates of goats under extensive conditions. *Small Rumin. Res.* 55, 191-198. [10.1016/j.smallrumres.2003.10.016](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.10.016)
- MELLADO, M., R. VALDEZ, J. GARCIA, R. LOPEZ, A. RODRIGUEZ (2006): Factors affecting the reproductive performance of goats under intensive conditions in a hot arid environment. *Small Ruminant Research* 63, 110-118 [10.1016/j.smallrumres.2005.02.016](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.016)
- MENZIES, P. I., R. MILLER (2007): Abortion in sheep: diagnosis and control. U: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Youngquist, R. S., W. R. Threlfall, urednici) Saunders. Elsevier. St. Louise. Missouri, SAD, str. 667-680
- METTAM, R. W. M. (1923): Snotsiekte in cattle. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 10, 395- 430.
- MILLER, J. M., M. J. VAN DER MAATEN (1987): Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1555–1558.
- MIOČ, B., V. PAVIĆ (2002): Reprodukcijska koza. U: *Kozarstvo*, 1 izdanje, Hrvatska mljekarska udruga, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 80-95
- MIYOSHI, M., Y. ISHII, M. TAKIGUCHI, A. TAKADA, J. YASUDA, A. HASHIMOTO, K. OKAZAKI, H. KIDA (1999): Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 375- 379. [10.1292/jvms.61.375](https://doi.org/10.1292/jvms.61.375)
- MOBINI, S. (2000): Reproductive management in goats. *Zbornik sažetaka u 17th annual North American Veterinary Conference.* 15-18 siječanj, Orlando, Florida, SAD, str. 219.

- MOCKENHAUPT, C., K. BAUER (1987): Untersuchungen zur caprinen arthritidenzaphalitis in Bayern und der einfluss seuchen-hygienischer massnahmen auf den verlauf dieser krankheit. Tier-arztl. Umsch, 42, 966-970.
- MONTAGNARO, S., S. DAMIANO, R. CIARCIA, M. V. PUZIO, G. FERRARA, V. IOVANE, I. M. FORTE, A. GIORDANO, U. PAGNINI (2019): Caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) as a potential candidate for oncolytic virotherapy. Cancer Biol Ther. 20, 42-51. [10.1080/15384047.2018.1504722](https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1504722)
- MORANTES, M., V. RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, C. ARCE, R. JIMÉNEZ-GRANADO, M. LÓPEZ-FARIÑA, M. RODRÍGUEZ-ZARCO, M. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ (2012): Distribución de partos, prolificidad y porcentaje de abortos en explotaciones de caprino lechero de raza Florida. U zborniku XXXVII Congreso SEOC, 17–21 rujan, Ciudad Real, Španjolska, str 373–377.
- MUSHI, E., F. RURANGIRWA (1981): Epidemiology of bovine malignant catarrhal fevers, a review. Vet. Res. Commun. 5, 127-142. [10.1007/BF02214977](https://doi.org/10.1007/BF02214977)
- MUSHI, E., L. KARSTADL, D. JESSETT (1980): Isolation of bovine malignant catarrhal fever virus from ocular and nasal secretions of wildebeest calves. Res. Vet. Sci. 29, 168-171. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32659-6](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32659-6)
- NAGAMALLESWARI, Y., M. P. IYYANGAR, S. GOPINATH, K. B. P. RAGHAVENDER (2004): Biometrical relationship of ovaries and pituitary during prepubertal period in goat (*Capra hircus*). Indian J. Anim. Sci. 74, 256–8.
- NAING, L., R. B. NORDIN, H. A. RAHMAN, Y. T. NAING (2022): Sample size calculation for prevalence studies using Scalex and ScalaR calculators. BMC Med. Res. Methodol. 22, 209 [10.1186/s12874-022-01694-7](https://doi.org/10.1186/s12874-022-01694-7)
- NALBERT, T., M. CZOPOWICZ, O. SZALUS, M. WITKOWSKI, L. WITKOWSKI, D. SŁONIEWSKA, D. URBAŃSKA, E. BAGNICKA, J. KABA (2019): Impact of the subclinical small ruminant lentivirus infection of female goats on the litter size and the birth body weight of kids. Prev. Vet. Med. 165, 71-75. [10.1016/j.prevetmed.2019.02.011](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.011)
- NOGUEIRA, D. M., B. GUMMOW, C. P. GARDINER, J. CAVALIERI, L. A. FITZPATRICK, A. J. PARKER (2015): A survey of the meat goat industry in

Queensland and New South Wales. 2. Herd management, reproductive performance and animal health. Anim. Prod. Sci. 56, 1533-1544. [10.1071/AN14794](https://doi.org/10.1071/AN14794)

NORTON, B. W. (2004): The role of the Boer goat in the development of the Australian goat meat industry. Final report project TR.012. Meat & Livestock Australia, Sydney, Australija

NOWAK, R., R. H. PORTER, F. LÉVY, P. ORGEUR, B. SCHAAL (2000): Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. Rev. Reprod. 5, 153-156. [10.1530/ror.0.0050153](https://doi.org/10.1530/ror.0.0050153)

NUGROHO, P., K. G. WIRYAWAN, D. A. ASTUTI, W. MANALU (2021): Stimulation of follicle growth and development during estrus in Ettawa Grade does fed a flushing supplement of different polyunsaturated fatty acids. Vet World. 14, 11-22. [10.14202/vetworld.2021.11-22](https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.11-22)

O'TOOLE, D., H. LI (2014): The pathology of malignant catarrhal fever, with an emphasis on ovine herpesvirus 2. Vet. Pathol. 51, 437–452. [10.1177/0300985813520435](https://doi.org/10.1177/0300985813520435)

PADILLA-RIVAS, G. R., B. SOHNREY, W. HOLTZ (2005): Early pregnancy detection by real-time ultrasonography in Boer goats. Small Rumin. Res. 58, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.09.004>

PASTOR-FERNÁNDEZ, I., E. COLLANTES-FERNÁNDEZ, L. JIMÉNEZ-PELAYO, L. M. ORTEGA-MORA, P. HORCAJO (2021): Modeling the Ruminant Placenta-Pathogen Interactions in Apicomplexan Parasites: Current and Future Perspectives. Front. Vet. Sci. 7, [10.3389/fvets.2020.634458](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.634458)

PATEL, J. R., S. DIDLICK (2008): Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses – An overview. S. Afr. vet. 79, 8–14. [10.4102/jsava.v79i1.233](https://doi.org/10.4102/jsava.v79i1.233)

PELLICER-RUBIO, M. T., B. LEBOEUF, D. BERNELAS, Y. FORGERIT, J. L. POUGNARD, J. L. BONNÉ, E. SENTY, S. BRETON, F. BRUN, P. CHEMINEAU (2008): High fertility using artificial insemination during deep anoestrus after induction and synchronization of ovulatory activity by the “male effect” in lactating goats subjected to treatment with artificial long days and progestagens. Anim Reprod Sci. 109, 172–88. [10.1016/j.anireprosci.2007.11.026](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.026)

PELLICER-RUBIO, M. T., K. BOISSARD, J. GRIZELJ, S. VINCE, S. FRERET, A. FATET, A. LOPEZ-SEBASTIAN (2018): Antonio Vers une maîtrise de la reproduction sans hormones chez les petits ruminants u 24e édition Congrès international francophone Les journées 3R : Rencontres - Recherches – Ruminants., 5-6 prosinac, Pariz, Francuska, str. 1-12

PHELPS, S. L., M. C. SMITH (1993): Caprine arthritis-encephalitis virus-infection. JAVMA, 203, 1663-1666 [10.2460/javma.1993.203.12.1663](https://doi.org/10.2460/javma.1993.203.12.1663)

PIPER, K. L., C. J. FITZGERALD, N. FICORILLI, M. J. STUDDERT (2008): Isolation of Caprine Herpesvirus 1 From a Major Outbreak of Infectious Pustular Vulvovaginitis in Goats. Aust. Vet. J. 86, 136–138. [10.1111/j.1751-0813.2008.00273.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2008.00273.x)

PLUMMER, P. J., K. M. STILL BROOKS, M. A. EDMONDSON (2021): Disease of the Mammary Gland. U: Sheep, Goat and Cervid Medicine. Treće izdanje. (Pugh, D. G., A. N. Baird, M. Edmondson, T. Passler, urednici). Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, str. 385-404.

POKORSKA J, D. KUŁAJ, M. DUSZA, J. ŻYCHLIŃSKA-BUCZEK, J. MAKULSKA (2016): New Rapid Method of DNA Isolation from Milk Somatic Cells. Anim Biotechnol. 27, 113-117. [10.1080/10495398.2015.1116446](https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1116446)

POSTE, G., N. KING (1971): Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. Vet. Rec. 88, 229–233. [10.1136/vr.88.9.229](https://doi.org/10.1136/vr.88.9.229)

QUEIROZ-CASTRO, V. L. D., E. P. DA COSTA, S. V. PEREIRA ALVES, J. D. GUIMARÃES, V. TELES DOHANIK, M. REBOUÇAS SANTOS, L. F. L. DE SOUZA, C. GOMIDES RIBEIRO, R. TOLEDO CALDAS, A. SILVA-JÚNIOR (2019): Detection of bovine herpesvirus 1 in genital organs of naturally infected cows. Theriogenology 130, 125-129. [10.1016/j.theriogenology.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.003)

RAE, M. T., S. PALASSIO, C. E. KYLE, A. N. BROOKS, R. G. LEA, D. W. MILLER, S. M. RHIND (2001): Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. Reproduction 122, 915-922. [10.1530/rep.0.1220915](https://doi.org/10.1530/rep.0.1220915)

REKIK, M., H. BEN OTHMANE, N. LASSOUED, C. SAKLY (2014): Efficiency of Oestrous Synchronization by GnRH, Prostaglandins and Socio-Sexual Cues in the North

African Maure Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 499-504. <https://doi.org/10.1111/rda.12319>

RESTALL, B. J. (1992): Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 305-318. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90145-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90145-4)

RHIND, S. M., D. A. ELSTON, J. R. JONES, J. R. REES, S. R., MCMILLEN, R. G. UNN (1998): Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Rumin. Res.* 30, 121-126. [10.1016/S0921-4488\(98\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00103-5)

ROBERTSON, S. M., T. ATKINSON, M. A. FRIEND, M. B. ALLWORTH, G. REFSHAUGE (2020): Reproductive performance in goats and causes of perinatal mortality: a review. *Anim. Prod. Sci.* 60, 1669-1680. [10.1071/AN20161](https://doi.org/10.1071/AN20161)

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ P, J. SIMÕES, C. ARCE, C. DÍAZ-GAONA, M. D. LÓPEZ-FARIÑAS, M. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, V. RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ (2022): Effect of Non-Genetic Factors on Reproduction of Extensive versus Intensive Florida Dairy Goats. *Vet Sci.* 9, 219 [10.3390/vetsci9050219](https://doi.org/10.3390/vetsci9050219)

ROMANO, J. E., D. FERNANDEZ ABELLA (1997): Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats, *Anim. Reprod. Sci.* 47, 107-112. [10.1016/S0378-4320\(96\)01633-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01633-8)

ROVNAK, J., S. L. QUACKENBUSH, R. A. REYES, J. D. BAINES, C. R. PARRISH J. W. CASEY (1998): Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol.* 72, 4237-42 [10.1128/jvi.72.5.4237-4242.1998](https://doi.org/10.1128/jvi.72.5.4237-4242.1998)

RUBIN, M., S. MODAI, S. RAYMAN, K. M. KAPLAN, E. MENDELSON, D. LICHTENBERG (2021): Antiviral properties of goat milk. *Clinical Nutrition open science* 37, 1-11. [10.1016/j.nutos.2021.03.002](https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.03.002)

RUSSELL, G. C., J. P. STEWART, D. M. HAIG (2009): Malignant catarrhal fever: a review. *Vet. J.* 179, 324-35. [10.1016/j.tvjl.2007.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.11.007)

SAITO, J. K., D. H. GRIBBLE, P. E. BERRIOS, H. D. KNIGHT, D. G. MCKERCHER (1974): A new herpesvirus isolate from goats: preliminary report. *Am. J. Vet. Res.* 35, 847-848

SAMARDŽIJA, M., D. ĐURČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Fiziologija rasplodivanja. U: Rasplodivanje ovaca i koza. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (SAMARDŽIJA, M., POLLETO, M., ur.), Zagreb, Hrvatska, str. 45-121.

SÁNCHEZ-DÁVILA, F., A. S. DEL BOSQUE GONZALES, H. B. BARRAGAN (2017): Reproduction in goats. InTechOpen. [10.5772/intechopen.70003](https://doi.org/10.5772/intechopen.70003)

SÁNCHEZ-DÁVILA, F., R. A. LEDEZMA-TORRES, G. PADILLA-RIVAS, A. S. DEL BOSQUE GONZÁLEZ, A. GONZÁLEZ GÓMEZ, H. BERNAL-BARRAGÁN (2014): Effect of three pFSH doses on superovulation and embryo quality in goats during two breeding seasons in north-eastern Mexico. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 40-43. [10.1111/rda.12350](https://doi.org/10.1111/rda.12350)

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A., P. VELLEMA, (2017): Notitie sterfte op beroepsmatige geitenbedrijven. 2017.

SENGER, P. L. (2015): Pathways to pregnancy and parturition. Treće izdanje. *Current Conceptions*, Redmon, Oregon, SAD. Str. 272-313.

SHELTON, M. (1978): Reproduction and breeding of goats. *J. Dairy Sci.* 61, 994-1010. [10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83680-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7)

SIMÕES J., J. C. ALMEIDA, R. VALENTIM, G. BARIL, J. AZEVEDO, P. FONTES, R. MASCARENHAS (2006): Follicular dynamics in Serrana goats. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.09.005>

SIMÕES, J., A. F. A. PIRES (2018): Reproductive disorders in Portuguese Serrana goats and its effects on milk production. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 31, 64-71. [10.17533/udea.rccp.v31n1a08](https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n1a08)

SIX, A., M. BANKS, M. ENGELS, C. R. BASCUÑANA, M. ACKERMANN (2001): Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Arch. Virol.* 146, 1325–1335. [10.1007/s007050170094](https://doi.org/10.1007/s007050170094)

SMITH, M. C. (1997): Clinical reproductive anatomy and physiology of the doe. U: Current therapy in large animal theriogenology (YOUNGQUIST, R. S., urednik). WB Saunders, Philadelphia, SAD, str. 535-537. [10.1016/B978-072169323-1.50072-6](https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50072-6)

SMITH, M. C. (2007): Clinical reproductive physiology and endocrinology of does. U: Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Youngquist, R. S., W. R. Threlfall, urednici) Saunders, Elsevier, St. Louise, Missouri, SAD, str. 535-537.

SMITH, M. C., R. CUTLIP (1988): Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 193, 63-67.

SNYMAN, M. A. (2010): Factors affecting pre-weaning kid mortality in South African Angora goats. SAJAS 40, 54-64. [10.4314/sajas.v40i1.54128](https://doi.org/10.4314/sajas.v40i1.54128)

SO-IN C., N. SUNTHAMALA (2023): Influence of goat management systems on hematological, oxidative stress profiles, and parasitic gastrointestinal infection. Vet World. 16, 483-490. [10.14202/vetworld.2023.483-490](https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.483-490)

SUAVET, F., J. L. CHAMPION, L. BARTOLINI, M. BERNOU, J. P. ALZIEU, R. BRUGIDOU, S. DARNATIGUES, G. REYNAUD, C. PERRIN, G. ADAM, R. THIÉRY, V. DUQUESNE (2016): First description of infection of caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) in goats in mainland France. Pathogens. 5, 17. [10.3390/pathogens5010017](https://doi.org/10.3390/pathogens5010017)

SUGUNA, K., S. MEHROTRA, S. K. AGARWAL, M. HOQUE, S. K. SINGH, U. SHANKER, T. SARATH (2008): Early pregnancy diagnosis and embryonic and fetal development using real time B mode ultrasound in goats, Small Rumin. Res. 80, 80-86, [10.1016/j.smallrumres.2008.10.002](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.10.002).

ŠPOLJARIC, B., S. VINCE, I. BUTKOVIĆ, J. F. VAZQUEZ ARMIJO, J. GRIZELJ (2017): Ovsynch efficiency in anoestrous dairy goats. Zbornik sažetaka, 7th International congress veterinary science and profession. 5.-7. Listopad 2017, Zagreb, Hrvatska, str. 101

TAMURA K., G. STECHER, S. KUMAR (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Mol. Biol. Evol. 38, 3022-3027. [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

TARIBA, B., A. KOSTELIC, B. ROIĆ, M. BENIĆ, D. SALAMON (2017): Influence of Caprine Arthritis Encephalitis Virus infection on milk production of French Alpine goats in Croatia. *Mljekarstvo*. 67, 42-48. [10.15567/mljekarstvo.2017.0105](https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0105)

TAUS, N. S., D. A. SCHNEIDER, J. L. OAKS, H. YAN, K. L. GAILBREATH, D. P. KNOWLES, H. LI (2010): Sheep (*Ovis aries*) airway epithelial cells support ovine herpesvirus 2 lytic replication in vivo. *Vet. Microbiol.* 145, 47-53. [10.1016/j.vetmic.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.013)

TEMPESTA, M., A. PRATELLI, G. GRECO, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (1999a): Detection of caprine herpesvirus 1 in sacral ganglia of latently infected goats by PCR. *J Clin Microbiol.* 37, 1598-1599 [10.1128/jcm.37.5.1598-1599.1999](https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1598-1599.1999)

TEMPESTA, M., A. PRATELLI, M. CORRENTE, C. BUONAVOGLIA (1999b): A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 137-143, [10.1016/S0147-9571\(98\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(98)00029-0)

TEMPESTA, M., G. GRECO, A. PRATELLI, D. BUONAVOGLIA, M. CAMERO, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2002): Reactivation of caprine herpesvirus 1 in experimentally infected goats. *Vet. Rec.* 4, 116–117. [10.1136/vr.150.4.116](https://doi.org/10.1136/vr.150.4.116)

TEMPESTA, M., M. CAMERO, G. GRECO, A. PRATELLI, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2001): A classical inactivated vaccine induces protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vaccine*. 19, 3860–3864. [10.1016/s0264-410x\(01\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00136-0)

TEMPESTA, M., M. CAMERO, R. L. SCIORSCI, G. GRECO, R. MINOIA, V. MARTELLA, A. PRATELLI, C. BUONAVOGLIA (2004): Experimental infection of goats at different stages of pregnancy with Caprine herpes virus 1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 25-32. [10.1016/S0147-9571\(03\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(03)00012-2)

THIRY, J., V. KEUSER, B. MUYLKENS, F. MEURENS, S. GOGEV, A. VANDERPLASSCHEN, E. THIRY (2006a): Ruminant Alphaherpesviruses Related to Bovine Herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37,169–190. [10.1051/vetres:2005052](https://doi.org/10.1051/vetres:2005052)

THIRY, J., V. KEUSER, F. SCHYNTS, C. CHARTIER, M. TEMPESTA, J. ESPEJOSERRANO, C. SAEGERMAN, E. THIRY (2006b): Evaluation de la prévalence sérologique de l'infection à herpèsvirus caprin 1 dans le sud-ouest de l'Europe. *Epidémiol. Santé Anim.* 49, 55–8.

THOMAS, C. R., A. FORSYTH, C. HART (1977): Goat placental lactogen: Levels through pregnancy and variation over 24 hour periods. J. Endocrinol. 75, 51–52.

TODD, C.G., B. BRUCE, L. DEEMING, G. ZOBEL (2019): Short communication: Survival of replacement kids from birth to mating on commercial dairy goat farms in New Zealand. JDS. 102, 9382-9388 [10.3168/jds.2019-16264](https://doi.org/10.3168/jds.2019-16264)

UMENE, K., H. SAKAOKA (1999): Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. Arch. Virol. 144, 637-56. [10.1007/s007050050533](https://doi.org/10.1007/s007050050533)

URRUTIA-MORALES, J., C. A. MEZA-HERRERA, L. TELLO-VARELA, M. O. DÍAZ-GÓMEZ, S. BELTRÁN-LÓPEZ (2012): Effect of nutritional supplementation upon pregnancy rates of goats under semiarid rangelands and exposed to the male effect. Trop. Anim. Health Prod. 44, 1473-1477. [10.1007/s11250-012-0090-8](https://doi.org/10.1007/s11250-012-0090-8)

UZAL F. A., L. WOODS, M. STILLIAN, R. NORDHAUSEN, D. H. READ, H. V. KAMPEN, J. ODANI, S. HIETALA, E. J. HURLEY, M. L. VICKERS, S. M. GARD (2004): Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus–1 infection in goats in California. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 478–484 [10.1177/104063870401600523](https://doi.org/10.1177/104063870401600523)

VANDEVANTER, D. R., P. WARRENER, L. BENNETT, E. R. SCHULTZ, S. COULTER, R. L. GARBER, T. M. ROSE (1996): Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. J. Clin. Microbiol. 7, 1666-1671 [10.1128/jcm.34.7.1666-1671.1996](https://doi.org/10.1128/jcm.34.7.1666-1671.1996)

VILLAQUIRAN, M., T. GIPSON, R. C. MERKEL, A. GOETSCH, T. SAHLU (2007): Body Condition Scores in Goats. Proc. 22nd Ann. Goat Field Day, Langston University, Langston, SAD, str. 125-131

VINCEK, D. A., J. KOSTELIC PRPIĆ, T. KEROS, L. JEMERSIC, Z. ROMAC, A. JUNGIC, D. BRNIC, B. ROIC, BESI (2020): Artritis Encefalitis Virus u koza u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2012. do 2019. godine serološko i molekularno istraživanje Vet. Stan 52. [10.46419/vs.52.1.11](https://doi.org/10.46419/vs.52.1.11)

VIÑOLES, C., A. GONZALEZ-BULNES, G. B. MARTIN, F. SALES, S. SALE (2009): Mouton et Chevre. U: Guide pratique d'echographie pour la reproduction des ruminants.

(Descoteaux, L., G. Gnemmi, J. Colloton, urednici). MED'COM, Pariz, Francuska. Str. 193-221.

VOGELSTEIN B., D. GILLESPIE (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. SAD 76, 615–619. [10.1073/pnas.76.2.615](https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615)

WADDELL L, N. PACHAL, M. MASCARENHAS, J. GREIG, S. HARDING, I. YOUNG, B. WILHELM (2019): Cache Valley virus: A scoping review of the global evidence. Zoonoses Public Health. 66, 739-758 [10.1111/zph.12621](https://doi.org/10.1111/zph.12621)

WANI, N. A., G. M. WANI, A. M. MUFTI, M. Z. KHAN (1998): Ultrasonic pregnancy diagnosis in goats. Small Rumin. Res. 29, 239-240. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(97\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(97)00123-5)

WEIR, J. P. (1998): Genomic Organization and Evolution of the Human Herpesviruses. Virus Genes. 16, 85-93. [10.1023/a:1007905910939](https://doi.org/10.1023/a:1007905910939)

WILLIAMS, N. M., M. L. VICKER, R. R. TRAMONTIN, M. B. PETRITESMURPHY, G. P. ALLEN (1997): Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in a goat herd. J. Am. Vet. Med. Assoc. 211, 89–91. [10.2460/javma.1997.211.01.89](https://doi.org/10.2460/javma.1997.211.01.89)

WINTER, A., C. PHYTHIAN (2013): Sheep Health, Husbandry and Disease. A Photographic Guide. Pregnancy. The Crowood Press , Marlborough, Wiltshire, Ujedinjeno Kraljevstvo str. 313-353.

WIYONO, A., S. I. BAXTER, M. SAEPULLOH, R. DAMAYANTI, P. DANIELS, H. W. REID (1994): PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. Vet. Microbiol. 42, 45-52. [10.1016/0378-1135\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90076-0)

YEŞİLBAĞ, K. (2007): Seroprevalence of malignant catarrhal fever-related gammaherpesviruses in domestic ruminants in Turkey. Trop. Anim. Health Prod. 39, 363–368. [10.1007/s11250-007-9024-2](https://doi.org/10.1007/s11250-007-9024-2)

ZARKAWI, M., A. SOUKOUTI (2001): Serum progesterone levels using Radioimmunoassay during oestrus cycle of indigenous Damascus does. N. Z. J. Agric. Res. 44, 165-169. [10.1080/00288233.2001.9513473](https://doi.org/10.1080/00288233.2001.9513473)

ZHU, H., H. QINGRONG, H. XIAOLIANG, C. WENHUI, Z. JIANLONG, J. LINLIN, Y. XIN, Z. XINGXIAO, C. SHIPENG (2018): Caprine herpesvirus 2-associated

malignant catarrhal fever of captive sika deer (*Cervus nippon*) in an intensive management system. BMC Vet. Res. 14, 38. [10.1186/s12917-018-1365-8](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1365-8)

ZINK, M. C., O. NARAYAN (1989): Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts replication of caprine arthritis-encephalitis virus. J. Virol., 63, 2578-2584. [10.1128/JVI.63.6.2578-2584.1989](https://doi.org/10.1128/JVI.63.6.2578-2584.1989)

ŽIAK, J., D. KOPTIDESOVÁ, I. OVEČKOVÁ, O. REJHOLCOVÁ, J. KOPÁČEK, M. KÚDELOVÁ, V. ZELNÍK (2014): Ovine herpesvirus 1 (OVHV-1) thymidine kinase locus sequence analysis: evidence that OVHV-1 belongs to the Macavirus genus of the Gammaherpesvirinae subfamily. Acta Virol. 58, 190-3. [10.4149/av_2014_02_190](https://doi.org/10.4149/av_2014_02_190)

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

9.1. Životopis

Rođen sam 6. lipnja 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam 2005. godine, a opću drugu gimnaziju 2009. godine u Zagrebu, nakon čega sam upisao integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao sam 11. siječnja 2018. godine. Tijekom studija bio sam aktivni član međunarodne studentske udruge „IVSA“, a dvije sam godine bio studentski predstavnik u Fakultetskom vijeću. Prisustvovao sam znanstvenim i stručnim skupovima iz različitih polja veterinarske medicine s ciljem unaprijeđivanja znanja i vještina. Šest mjeseci proveo sam volontirajući u Veterinarskoj ambulanti „Bibino“ u Zagrebu, te nakon stečenog osnovnog znanja kliničke obrade pacijenata započinjem s volontiranjem u klinici za zarazne bolesti životinja na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom u trajanju od tri godine.

Na navedenoj klinici stekao sam interes za virusne bolesti životinja, te sam odlučio napraviti diplomski istraživački rad u virusološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom pod mentorstvom doc. dr. sc. Vladimira Stevanovića. Istraživanje pod nazivom „Učestalost, čimbenici rizika i klinički značaj infekcije pasa bocavirusom“, u sklopu projekta dijagnostike virusnih gastroenteritisa pasa na području Republike Hrvatske, radio sam dvije godine i stekao sam znanja provedbe molekularnih dijagnostičkih metoda infektivnih bolesti. Praksu određenu nastavnim programom odradio sam u Veterinarskoj ambulanti „Buba“ u Zagrebu.

Od 9. travnja 2018. zaposlen sam u znanstveno-suradničko zvanje asistent, na Klinici za porodništvo i reprodukciju na Veterinarskom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu. Iste godine upisujem Poslijediplomski doktorski studij Veterinarske znanosti.

Do sada sam autor ili koautor 29 objavljenih stručnih i znanstvenih radova.

9.2 Popis objavljenih znanstvenih radova

ŠAVORIĆ, J., V. STEVANOVIĆ, S. VINCE, I. MATIĆ, J. GRIZELJ, M. LOJKIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. SAMARDŽIJA, T. KARADJOLE, B. ŠPOLJARIĆ (2024): Reproductive success in goats: A review of selected impacting factors. Vet. Stanica. 5, 585–593, <https://doi.org/10.46419/vs.55.5.8>

PRVANOVIĆ BABIĆ, N., A. PLEĆAŠ, M. BABAN, M. LOJKIĆ, I. GETZ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. MAĆEŠIĆ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. SAMARDŽIJA (2023): Influence of Global Warming and Heat Stress on Equine Reproduction. Zbornik radova u 1st International Scientific Conference, The role and status of modern agriculture in climate change: innovative and sustainable approaches: 1st International Scientific Conference, 19-22 Rujna, Osijek, Hrvatska, str. 49-49

BUTKOVIĆ, I., S. VINCE, J. GRIZELJ, G. BAČIĆ, I. GETZ, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, J. ŠAVORIĆ, I. FOLNOŽIĆ, I. TOMIĆ, K. KLAŠTERKA, B. ŠPOLJARIĆ (2023): Neonatologija kod pasa - kad, što i kako? Zbornik radova u 14. Naučni simpozijum Reprodukcijska životinja, 12-15 Listopada, Divčibare, Srbija, str. 155-160

MARTINA, L., B. ŠPOLJARIĆ, G. BAČIĆ, J. ŠAVORIĆ, N. MAĆEŠIĆ, A. ZABRET, T. KARADJOLE (2023): Upotreba ohlađenog i duboko smrznutog sjemena u rasplodivanju pasa. Zbornik radova znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem Veterinarski dani. 26-29 Listopad, Osijek, Hrvatska, str. 24-26

VLAHEK, I., V. SUŠIĆ, A. EKERT KABALIN, S. MENČIK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, A. PIPLICA, J. ŠAVORIĆ, S. FARAGUNA (2023): Prediction of reproductive performance of ewes based on the early production data, ewe birth rank, dam age and dam birth rank, Arch. Anim. Breed 66; 145-151. doi: [10.5194/aab-66-145-2023](https://doi.org/10.5194/aab-66-145-2023)

LOJKIĆ, M., B. ŠPOLJARIĆ, I. BUTKOVIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, S. VINCE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, N. MAĆEŠIĆ, I. FOLNOŽIĆ I. GETZ, J. GRIZELJ, J. ŠAVORIĆ, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2023): Implementation of models for teaching reproduction and obstetrics on Faculty of veterinary medicine University of Zagreb, U zborniku radova ICEAS III, 15.-16. lipanj, Zagreb, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska, str. 58-58

ŠPOLJARIĆ, B., M. LOJKIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, N. MAĆEŠIĆ, S. VINCE, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ (2023): Workshop „Artificial insemination in bitch“ as an example of online education. U zborniku ICEAS III 15.-16. Lipanj, Zagreb, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska, str. 65-65

VLAHEK, I., V. SUŠIĆ, A. EKERT KABALIN, S. MENČIK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, A. PIPLICA, J. ŠAVORIĆ, S. FARAGUNA (2023): Funkcionalna svojstva u mliječnim goveda. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora, 31, str. 48-58

BUTKOVIĆ, I., K. KLAŠTERKA, I. TOMIĆ, K. PAVLIČEK, J. ŠAVORIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. SAMARDŽIJA (2023): Use of antibiotics in neonatal patients – challenges and new approaches. U zborniku - 2nd International Conference: Antimicrobial resistance in veterinary medicine - current state and perspectives. 22.-24. lipanj, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija, . str. 26-27

KARADJOLE, T., LJ. FUČKALA, LJ. BEDRICA, N. MAĆEŠIĆ, G. BAČIĆ, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. EFENDIĆ, M. TOMIĆ, V. SOKOL KARADJOLE, S. KUNŠTEK, M. LOJKIĆ (2023): Pokazatelji ukupnog antioksidacijskog statusa kuja prije i nakon ovarijektomije. Vet. stanica, 54 87-94. [10.46419/vs.54.1.3](https://doi.org/10.46419/vs.54.1.3)

KLASTERKA, K., N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, J. ŠAVORIĆ, G. BAČIĆ, S. VINCE, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, M. SAMARDŽIJA, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, I. GETZ, J. GRIZELJ (2023): Hitna neonatologija mačića. Vet. stanica, 54, 451-466. [10.46419/vs.54.4.9](#)

VLAHEK, I., V. SUŠIĆ, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, A. PIPLICA, J. ŠAVORIĆ, S. FARAGUNA, H. KABALIN (2023): Non-genetic factors affecting litter size, age at first lambing and lambing interval of Romanov sheep in Croatia. Vet. stanica, 54, 311-320. [10.46419/vs.54.3.6](#)

MEGLIĆ, P., B. ŠPOLJARIĆ, G. ŠTIBRIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, J. ŠAVORIĆ, I. FOLNOŽIĆ, J. GRIZELJ, I. BUTKOVIĆ, D. GEREŠ, S. VINCE (2023): Ovsynch based protocols in reproductive management and infertility treatment in dairy cows - when and why? Vet. stanica, 54, 213-222. [10.46419/vs.54.2.8](#)

LOJKIĆ, M. I. RAIČ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, I. BUTKOVIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, I. GETZ, I. FOLNOŽIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. SAMARDŽIJA, N. MAČEŠIĆ (2023): Dual sire insemination in dogs. Vet. stanica, 54, 29-37. [10.46419/vs.54.1.9](#)

PRVANOVIĆ BABIĆ, N. A. PLEĆAŠ, M. LOJKIĆ, I. GETZ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. SAMARDŽIJA (2022): Utjecaj globalnog zatopljenja i toplinskog stresa na rasplodivanje konja U zborniku Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem "Veterinarski dani 2022." 20-23. listopada, Poreč, Hrvatska, str. 65-71

GRIZELJ, J., M. T. PELLICER-RUBIO, B. ŠPOLJARIĆ, F. SÁNCHEZ DÁVILA, S. FRERET, A. FATET, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, S. VINCE (2022): Nonhormonal Reproductive Management in Goat Breeding Corpus CJDVS 3, 1048 [10.54026/CJDVS/1048](#)

VINCE, S., A. M. VEČKOVEC, H. VALPOTIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, I. ŽURA ŽAJA, D. ĐURIČIĆ, D. LEINER, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, B. HABRUN, B. NJARI, A. KOVŠCA JANJATOVIĆ, M. EFENDIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. POPOVIĆ, I. VALPOTIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2022): (Immunogenicity of a live bivalent non enterotoxigenic Escherichia coli (non-ETEC) vaccine and dietary clinoptilolite efficacy against postweaning diarrheal disease of pigs due to F4+ and F18+ ETEC strains. Vet. arh 92, 259-276. [10.24099/vet.arhiv.1537](https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1537)

LOJKIĆ, M., N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, B. ŠPOLJARIĆ, S. VINCE, G. BAČIĆ, I. GETZ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, I. FOLNOŽIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, A. DOBOS, G. JAKOVLJEIĆ, M. SAMARDŽIJA (2022): A retrospective study of the relationship between canine age, semen quality, chilled semen transit time and season and whelping rate and litter size. Vet. arh., 92, 301-310. [0.24099/vet.arhiv.1733](https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1733)

MAČEŠIĆ, N., I. BAČIĆ, G. BAČIĆ, M. LOJKIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. EFENDIĆ, T. KARADJOLE (2022): et al. Selektivno zasušivanje mliječnih krava // Vet stanica, 53, 735-743. [10.46419/vs.53.6.8](https://doi.org/10.46419/vs.53.6.8)

BUTKOVIĆ, I., K. KLAŠTERKA, M. TORTI, N. KOLUDROVIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, I. TOMIĆ, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, J. ŠAVORIĆ, G. BAČIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, M. SAMARDŽIJA, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, S. VINCE (2021): Unilateral segmental aplasia of the uterine horn with pyometra, U zborniku 9th International Congress "Veterinary Science and Profession" 9. listopad, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska, str. 94-94

VLAHEK, I., A. EKERT KABALIN, S. MENČIK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, A. PIPLICA, H. KABALIN, J. ŠAVORIĆ, V. SUŠIĆ (2021): The effect of non-genetic factors on the birth weight of Romanov sheep. Vet. arh 91, 615-624. [10.24099/vet.arhiv.1487](https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1487)

GHOSH, C. P., S. DATTA, D. MANDAL, A. DAS, D. ROY, A. H. ROY, N. K. TUDU (2019): Body condition scoring in goat: Impact and significance. J. Entomol. Zool. Stud. 7, 554-560.

ARTECHE-VILLASOL, N., M. FERNÁNDEZ, D. GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, V. PÉREZ (2022): Pathology of the Mammary Gland in Sheep and Goats. J Comp Pathol. 193, 37-49. [10.1016/j.jcpa.2022.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2022.02.007)

KNEŽEVIĆ, K., V. DOBRANIĆ, D. ĐURIČIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, I. GETZ, M. EFENDIĆ, L. CVETNIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, M. CVETNIĆ, M. MAZIĆ, N. MAČEŠIĆ (2021): Primjena broja somatskih stanica za dijagnostiku mastitisa i utjecaj na kakvoću mlijeka. Vet. stanica, 52, 751-764. [10.46419/vs.52.6.11](https://doi.org/10.46419/vs.52.6.11)

SAMARDŽIJA, M., M. LOJKIĆ, N. MAČEŠIĆ, H. VALPOTIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. ŽURA ŽAJA, D. LEINER, D. ĐURIČIĆ, F. MARKOVIĆ, P. KOČILA, Z. VIDAS, M. GERENČER, A. KAŠTELAN, A. MILOVANOVIĆ, M. LAZAREVIĆ, D. RUKAVINA, I. VALPOTIĆ (2020): Reproductive immunology in viviparous mammals: evolutionary paradox of interactions among immune mechanisms and autologous or allogeneic gametes and semiallogeneic fetuses. Vet. Q. 40, 353-383. [10.1080/01652176.2020.1852336](https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1852336)

BUTKOVIĆ, I., S. VINCE, K. MARJANOVIĆ, I. FOLNOŽIĆ, N. MAČEŠIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. LOJKIĆ, D. ĐURIČIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE (2020): Laparoscopic ovariectomy in a pygmy goat. Vet Med (Praha) 65, 409-414. [10.17221/113/2020-VETMED](https://doi.org/10.17221/113/2020-VETMED)

ŠPOLJARIĆ, B., D. SVOBODA, D. GEREŠ, S. VINCE, D. ŠPOLJARIĆ, M. POPOVIĆ, D. ŽUBČIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, J. GRIZELJ, M. SAMARDŽIJA (2020): Combination of dopamine agonist and prostaglandin administration for pregnancy termination in bitches – a novel approach. J. Appl. Anim. Res, 48, 402-405. [10.1080/09712119.2020.1814784](https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1814784)

GRIZELJ, J., S. VINCE, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2019): The usage of hormonal serological profiles in advancement of sexual season in goats. Zbornik sažetaka u 11th National Congress with International Participation and 37th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 20.-23. lipanj, Constanta, Rumunjska, str. 86-86

STEVANOVIĆ, V., J. ŠAVORIĆ, A. MILJAN, K. KOVAČ, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, LJ. BARBIĆ, V. STAREŠINA, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA, S. KOVAČ, K. GRACIN, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, Z. MILAS (2018): Clinical importance and molecular epidemiology of canine minute virus infections in dogs. U zborniku 11th International Congress for Veterinary Virology. 27.-30. kolovoz, Beč, Austrija, str. 112

GRIZELJ, J., B. ŠPOLJARIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, S. VINCE (2018): The use of non-hormonal methods and artificial insemination in dairy goat oestrous synchronization. U zborniku XLIII Congreso nacional y xix congreso internacional de la sociedad Española de ovinotecnia y caprinotecnia, 19.-21. rujan Zaragoza, Španjolska, str. 211-218