

# Filogenetska analiza VP2 gena parvovirusa pasa u Republici Hrvatskoj

---

Miljan, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:364835>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-16**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

**Veterinarski fakultet**

**Ana Miljan**

**FILOGENETSKA ANALIZA VP2 GENA PARVOVIRUSA  
PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2017.**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: doc. dr. sc. Suzana Hađina

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Zoran Milas
2. akademik prof. dr. sc. Josip Madić
3. doc. dr. sc. Suzana Hađina
4. doc. dr. sc. Vladimir Stevanović (zamjena)

## Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri i Ivanu na potpori i strpljenju kroz sve godine studiranja te svojim prijateljima i kolegama koji su studij učinili nezaboravnim.

Posebnu zahvalu dugujem svojim mentorima; doc. dr. sc. Suzani Hađini i doc. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću bez kojih ovaj diplomski nikada nebi bio napisan.

Zahvaljujem i svim djelatnicima i volonterima ovog Zavoda na sakupljanju uzoraka i svakoj pomoći koju su mi pružili u smislu savjeta i podrške, te doc. dr. sc. Maji Maurić na pomoći sa statističkom obradom podataka.

## Popis kratica

CPV-1 = (*eng. canine parvovirus-1*) pseći parvovirus-1

CMV = (*eng. canine minute virus*) minutni virus pasa

CPV-2 = (*eng. canine parvovirus-2*) pseći parvovirus-2

CPV-2a = pseći parvovirus-2 podtip a

CPV-2b = pseći parvovirus-2 podtip b

CPV-2c = pseći parvovirus-2 podtip c

FPV = (*eng. feline panleukopenia virus*) virus mačje panleukopenije, mačji parvovirus

VP = strukturalni kapsidni protein

NS = nestrukturalni protein

ORF = (*eng. open reading frame*) otvoreni okvir čitanja

NCR = (*eng. noncoding region*) nekodirajuća regija

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

PCR = (*eng. polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom

pb = parovi baza

ML = (*eng. maximum likelihood*) najveća vjerojatnost

RNK-aza = ribonukleaza

DNK-aza = deoksiribonukleaza

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

TAE = tris acetat etilendiamintetraoctena kiselina

ANOVA = analiza varijance

PPV = pozitivna prediktivna vrijednost

NPV = negativna prediktivna vrijednost

Asn = asparagin

Asp = asparaginska kiselina

Glu = glutamin

Ser = serin

Met = metionin

Ile = izoleucin

Thr = treonin

Ala = alanin

Gly = glicin

Tyr = tirozin

Val = valin

SAD = Sjedinjene Američke Države

RH = Republika Hrvatska

## Popis tablica, slika i grafikona

### Grafikoni:

Grafikon 1. Zastupljenost pojedinih podtipova CPV-2 na području grada Zagreba.

Grafikon 2. Prevalencija infekcije CPV-2 u različitim dobnim skupinama.

### Slike:

Slika 1. Shematski prikaz građe površine kapside CPV-2 virusa.

Slika 2. Prikaz položaja beta ploča i alfa petlji u strukturi gradivne jedinice kapside CPV-2 virusa.

Slika 3. Položaj aminokiselinskih ostataka u gradivnoj subjedinici kapside.

Slika 4. Položaji otvorenih okvira čitanja u u genomu CPV-2.

Slika 5. Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku.

Slika 6. Izmjena A3675G u CPV-2a s područja grada Zagreba.

Slika 7. Izmjena A4496G u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 8. Izmjene nukleotida na poziciji 3756 i 3757 u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 9. Izmjene nukleotida na poziciji 3878, 3888 i 3903 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 10. Izmjene nukleotida na poziciji 4061 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 11. Izmjene nukleotida na poziciji 4193 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 12. Izmjene aminokiselina na poziciji 297 i 324 u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 13. Izmjene aminokiselina na poziciji 373 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba.

Slika 14. Filogenetsko stablo CPV-2a sojeva.

Slika 15. Filogenetsko stablo CPV-2c sojeva.

Tablice:

Tablica 1. Razlike u aminokiselinskom sastavu VP2 proteina različitih podtipova CPV-2.

Tablica 2. Podaci o životinjama korišteni za statističku obradu.

Tablica 3. Početnice za umnažanje odsječka genoma CPV-2 korištene u izvođenju metode lančane reakcije polimerazom.

Tablica 4 . Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Tablica 5. Formule za izračunavanje osnovnih vrijednosti koje opisuju dijagnostički test.

Tablica 6. Razlike u aminokiselinskom sastavu VP2 proteina različitih podtipova CPV-2.

Tablica 7. Podtip CPV-2a - uzorci s potpuno istovjetnim nukleotidnim slijedovima.

Tablica 8. Podtip CPV-2c - uzorci s potpuno istovjetnim nukleotidnim slijedovima.

Tablica 9. Popis pristupnih brojeva nukleotidnih slijedova referentnih sojeva CPV-2.

Tablica 10. Oznaka i pristupni broj nukleotidnih slijedova CPV-2a korištenih za filogenetsku analizu.

Tablica 11. Oznaka i pristupni broj nukleotidnih slijedova CPV-2c korištenih za filogenetsku analizu.



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	9
2. PREGLED LITERATURE .....	11
2.1. Povijest .....	11
2.2. Etiologija .....	11
2.2.1. Građa virusne čestice .....	11
2.2.2. Građa genoma .....	15
2.3. Taksonomija i klasifikacija.....	15
2.4. Tenacitet .....	16
2.5. Proširenost .....	16
2.6. Epizootiologija.....	16
2.7. Patogeneza.....	17
2.8. Klinička slika.....	17
2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz.....	17
2.10. Dijagnostika .....	18
2.11. Liječenje.....	19
2.12. Imunoprofilaksa .....	19
2.13. Javno zdravstvo.....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Uzorkovanje.....	21
3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika.....	21
3.2.1. Priprema uzoraka.....	21
3.2.2. Izdvajanje virusne DNK.....	21
3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR) .....	22
3.2.4. Elektroforeza u gelu .....	24
3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze.....	25
3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a .....	26
3.4. Statistička obrada podataka .....	26
4. REZULTATI.....	27
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. LITERATURA .....	48

8. SAŽETAK .....	55
9. SUMMARY .....	56
10. ŽIVOTOPIS .....	57

# 1. UVOD

Pseći parvovirus-2 (*eng. canine parvovirus, CPV-2*) je jedan od najčešćih uzročnika akutnih gastroenteritisa u pasa te se zbog svoje proširenosti i težine kliničke slike smatra vjerojatno najvažnijom zaraznom bolesti pasa općenito (CARMICHAEL i BINN, 1981.; GREEN i DECARO, 2011.). Pseći parvovirus-2 nastao je evolucijskim izmjenama parvovirusa divljih mesojeda, posebice izmjenama u aminokiselinskom sastavu dijela virusne kapside koja je odgovorna za prepoznavanje i vezanje receptora na stanicama (TRUYEN i sur., 1995.; HORIUCHI i sur., 1998.). Izmjene genetskog materijala, koje su omogućile preskakanje međuvrsne barijere i širenje virusa u populaciji pasa, događaju se i danas te su danas poznata tri podtipa ovog virusa (CPV-2a, CPV-2b i CPV-2c) s velikim brojem sojeva unutar istih (BUONAVOGLIA i sur., 2001.; SHACKELTON i sur., 2005.). Zastupljenost pojedinih podtipova virusa razlikuje se između pojedinih država, te čak pojedinih područja unutar iste države, a uvjetovana je s za sada još nedovoljno poznatim epizootiološkim čimbenicima (DECARO i sur., 2007a.; DECARO i sur., 2011.; MIRANDA i sur., 2016.). Vrlo je značajno da se pojedini podtipovi i sojevi unutar podtipova razlikuju upravo u aminokiselinskim ostacima koji grade virusne izdanke i koji uvjetuju antigenske osobine virusa te imunosti odgovor domaćina (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). Zbog navedenog, sasvim su shvatljiva pitanja stručne i znanstvene javnosti o utjecaju pojedinih podtipova virusa na kliničko očitovanje bolesti (GODSALL i sur., 2010.; MARKOVICH i sur., 2012.), na razinu zaštite koju pružaju komercijalno dostupna cjeviva, koja većinom sadrže izvorni CPV-2 podtip (SPIBEY i sur., 2008.; SIEDEK i sur., 2011.), te utjecaj podtipova virusa na osjetljivost standardno korištenih metoda dijagnostike (NEUERER i sur., 2008.; DECARO i sur., 2010.). Iako je bolest prvi put opisana na području Republike Hrvatske davne 1980. godine (CVETNIĆ, 1980.) do danas ne postoje podaci o opsežnijem istraživanju epizootiologije parvovirusne infekcije pasa u našoj zemlji. Istraživanje provedeno za potrebe izrade ovog diplomskog rada daje prve opsežne podatke o proširenosti, čimbenicima rizika, kliničkom očitovanju te molekularnoj epizootiologiji infekcije parvovirusom pasa na području grada Zagreba. Ovo istraživanje daje odgovore i na pitanja o utjecaju različitih podtipova CPV-2 na kliničku sliku, duljinu i ishod liječenja, stupanj zaštite koje daje imunoprofilaksa te na rezultate

dijagnostičkih metoda korištenih u svakodnevnoj praksi, a to su pitanja koja imaju svjetski značaj.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Povijest

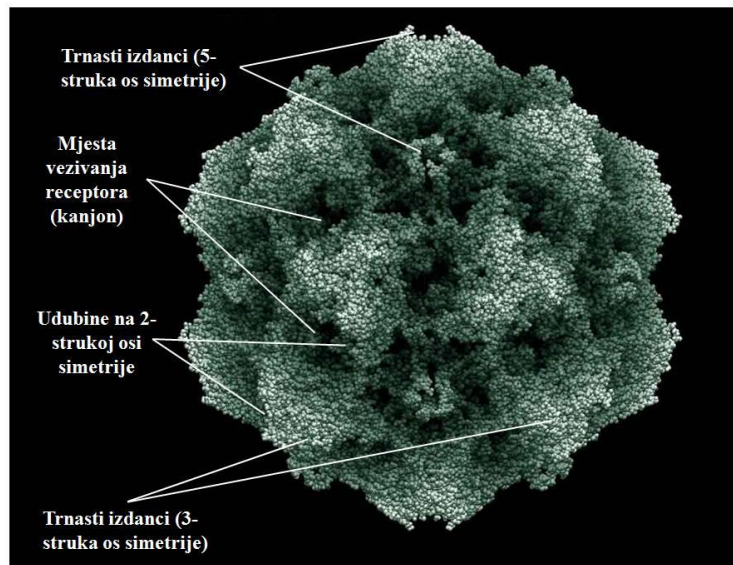
Infekcija parvovirusom pasa je opisana kao nova virusna zarazna bolest pasa 1978. godine kada su zabilježena masovna oboljenja štenaca u vidu miokarditisa i hemoragičnog gastroenteritisa diljem Europe i Sjeverne Amerike (APPEL i sur., 1979.). Uzročnik je dobio ime pseći parvovirus-2 kako bi ga se razlikovalo od minutnog virusa pasa (*eng. canine minute virus-CMV, eng. canine parvovirus-1, CPV-1*) koji se antigenski razlikuje od CPV-2 te uzrokuje neonatalna uginuća štenadi (CARMICHAEL i BINN, 1981.; CARMICHAEL i sur., 1994.). Podaci o evoluciji i filogenetska analiza parvovirusa ukazuju da CPV-2 potječe od virusa divljih mesojeda sličnom mačjem parvovirusu (*eng. feline parvovirus, FPV*) koji se prilagodio psima kao novim domaćinima (TRUYEN i sur., 1995.; HORIUCHI i sur., 1998.). Od prvog opisa virusa 1978. godine CPV-2 je genetskim mutacijama evoluirao u dva podtipa: pseći parvovirus-2a (CPV-2a) (PARRISH i sur., 1985.; PARRISH i sur., 1991.) i pseći parvovirus-2b (CPV-2b) (PARRISH i sur., 1991.) koji su u potpunosti zamijenili originalni tip 2 i proširili se unutar pseće populacije diljem svijeta (MOCHIZUKI i sur., 1993a.; DE YBANEZ i sur., 1995.; GREENWOOD i sur., 1996.; TRUYEN i sur., 1996.; STEINEL i sur., 1998.; SAGAZIO i sur., 1998.; PEREIRA i sur., 2000.; BUONAVOGLIA i sur., 2001.). Tijekom sljedećih desetak godina izmjene u aminokiselinskom sastavu dovele su do emergencije novog podtipa virusa pod nazivom pseći parvovirus-2c (*eng. canine parvovirus 2c, CPV-2c*) koji se vrlo brzo proširio diljem Europe (BUONAVOGLIA i sur., 2001.).

### 2.2 Etiologija

#### 2.2.1. Građa virusne čestice

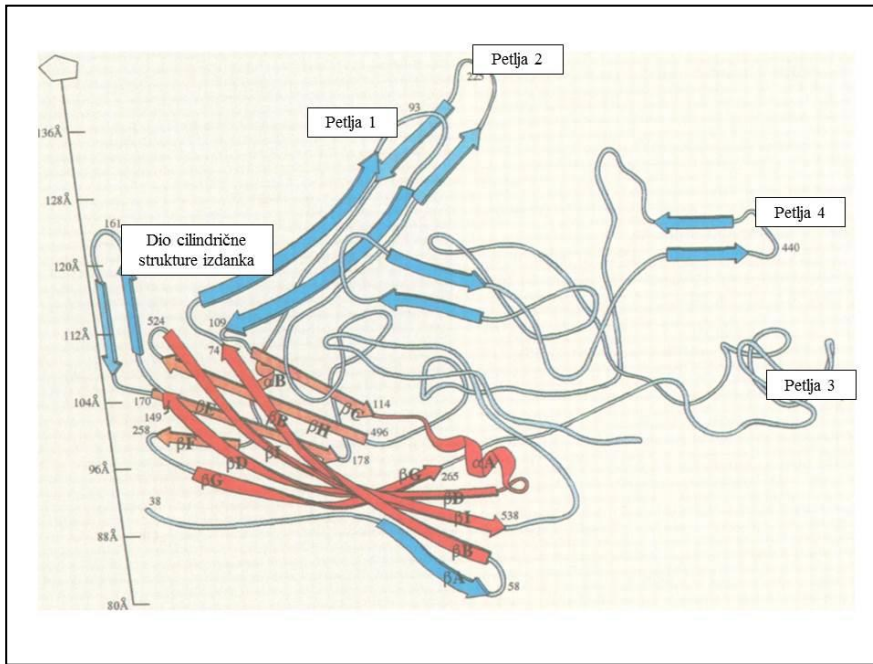
Parvovirusi (Slika 1.) su izrazito mali virusi promjera oko 25 nm, koji imaju jednolančanu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK). Kapsida virusa je ikozaedralne simetrije te je izgrađena od VP1, VP2 i VP3 proteina. (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). Protein VP2 je najzastupljeniji i čini gotovo 90% kapside te je glavni nositelj antigenskih svojstava virusa, ali je i odgovoran za interakciju virusa sa staničnim receptorima te na taj način određuje spektar domaćina za pojedini virus (PARRISH i sur., 1991; TRUYEN i sur., 1996.). Enzimatskim cijepanjem VP2 u domaćinu nastaje VP3 protein, dok VP1 protein sadrži dodatnu N-

terminalnu regiju nadodanu na cijeli aminokiselinski slijed VP2 proteina (JONGENEEL i sur., 1986.).

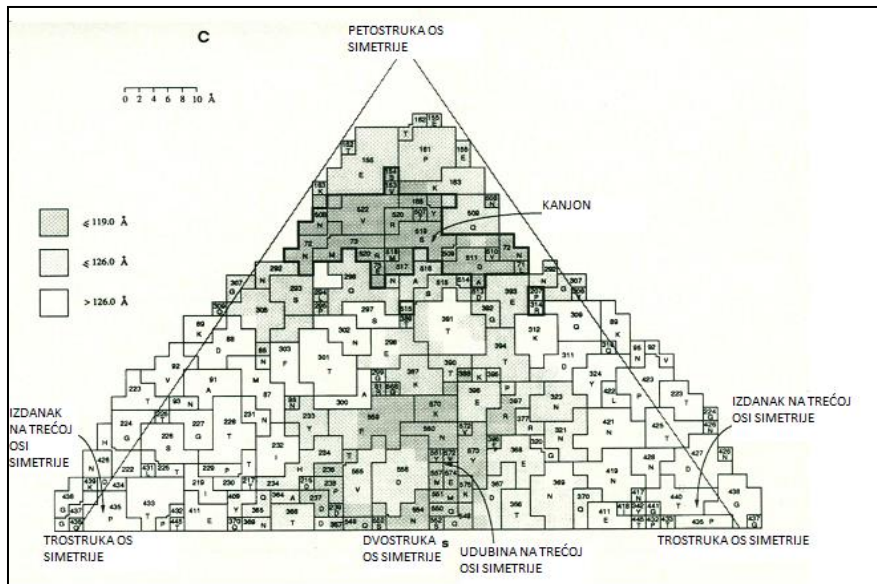


**Slika 1.** Shematski prikaz građe površine kapside CPV-2 virusa. Prilagođeno iz TSAO i sur., 1991.

Elektronskom mikroskopijom ustanovljeno je da se kapsida sastoji od 60 istovjetnih gradivnih podjedinica nastalih kombiniranjem VP1 i VP2 (TSAO i sur., 1991.; ALLISON i sur., 2014.). Svaka pojedinačna podjedinica se sastoji od osam beta ploča koje su međusobno povezane s četiri petlje. Beta ploče grade udubine uz petostruke osi simetrije, na površini virusa, koje se nazivaju kanjoni i smatra se da su mjesto vezanja za receptore na stanicama (TSAO i sur., 1991.; TRUYEN i sur., 1995.; HUEFFER i PARRISH, 2003.; NAKAMURA i sur., 2004.). Petlje (Slika 2.) grade velike izdanke nalik šiljcima na trostrukim osima simetrije, te se smatra da se protutijela domaćina upravo vežu na aminokiselinske ostatke ovih nastavaka (TSAO i sur., 1991.; HUEFFER i PARRISH, 2003.; MACLACHAN i DUBOVI, 2011.). Na površini virusne kapside još razlikujemo cilindrične, manje, izdanke na petostrukim osima simetrije te mala udubljenja na dvostrukim osima simetrije. Smatra se da je osnovna uloga ovih manjih udubljenja da mjesto vezanja za stanične receptore, tzv. kanjone, učine još nedostupnijim protutijelima (Slika 3.) (TSAO i sur., 1991.).



**Slika 2.** Prikaz položaja beta ploča i alfa petlji u strukturi gradivne jedinice kapside CPV-2 virusa. Prilagođeno iz TSAO i sur., 1991.



**Slika 3.** Položaj aminokiselinskih ostataka u gradivnoj subjedinici kapside. Prilagođeno iz TSAO i sur., 1991.

Neposredni dokaz uloge pojedinih struktura na površini kapside psećeg parvovirusa-2 predstavlja praćenje evolucije ovog virusa od njegovog prvog opisa do danas. Izvorni izolat psećeg parvovirusa (danas poznat pod oznakom CPV-2) razlikuje se od ishodišnog virusa mačje panleukopenije u minimalno šest ili sedam aminokiselinskih ostataka koji se većinom nalaze u kanjonu koji je odgovoran za vezanje na transferinski receptor te se smatraju odgovornim za promjenu domaćina s pripadnika porodice mačaka i divljih mesojeda na pripadnike porodice *Canidae* (Tablica 1.). Kako se zbog izrazito teške prirode bolesti ubrzo pristupilo imunoprofilaksi ove bolesti u pasa, smatra se da je ovo barem dijelom bilo odgovorno za pojavu novog podtipa virusa CPV-2a već 1979. godine. Podtip CPV-2a se razlikovao od CPV-2 u pet aminokiselinskih promjena na VP2 genu: Met87Leu, Ile101Thr, Ala300Gly, Asp305Tyr i Val555Ile. Četiri od pet navedenih aminokiselina sudjeluju u građi izdanaka na trostrukoj osi simetrije, za koje se smatra da su mjesta vezanja protutijela te je novonastali podtip psećeg parvovirusa mogao barem dijelom izbjeći imunosni odgovor domaćina. Promjena aminokiselinskog ostatka na mjestu 555 je ustanovljena u samo dvije od 1119 danas dostupnih slijedova aminokiselina te se ne smatra važnom za razlikovanje CPV-2 i CPV-2a (ZHOU i sur., 2017.). Pseći parvovirus-2b (CPV-2b), opisan 1984. godine, razlikuje se od CPV-2a u izmjeni dviju aminokiselina: Asn na 426. mjestu u Asp, a Ile na 555. mjestu je povratno promijenjen u Val, kakav je i u izvornom CPV-2 (PARRISH i sur., 1991.). Najnoviji podtip, pseći parvovirus-2c (CPV-2c), opisan je 2001. godine. Naknadnim pretraživanjem arhivskih uzoraka fecesa pasa dokazan je u uzorku koji potječe iz Njemačke i datira iz 1997. godine, a razlikuje se od druga dva podtipa aminokiselinskim izmjenama na 426. mjestu (Glu umjesto Asn) i 300. mjestu (Gly umjesto Asp) (IKEDA i sur., 2000.; BUONAVOGLIA i sur., 2001.). Osim navedenih opisane su i nove aminokiselinske izmjene u CPV-2a i CPV-2b na položaju 297 i 300 pri kojima dolazi do izmjene Ser297Ala i Gly300Asp (Tablica 1.) (ZHOU i sur., 2017.). Aminokiselinski ostatak na mjestu 297 utječe na antigenska svojstva virusa, a na 300. mjestu utječe na mogućnost umnažanja virusa u različitim vrsta domaćina i stabilnost kapside (TSAO i sur., 1991.; PARKER i PARRISH, 1997.; TRUYEN, 2006.).



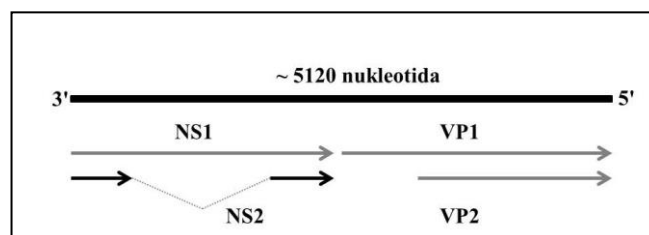
**Tablica 1.** Razlike u aminokiselinskom sastavu VP2 proteina različitih podtipova CPV-2

Aminokiselinskiostatak	80	87	93	101	103	232	297	300	305	323	375	426	555	564	568
Pozicijanukleotida	3024-30263045-30473063-30653087-30893093-30953480-34823675-36773684-36863699-37013753-37553909-39114062-40644449-44514476-44784488-4490														
Proužavanikodon	AAA (Lys)	ATG (Met)	AAA (Lys)	ATT (Ile)	GUA (Val)	GTA (Val)	TCT (Ser)	GCT (Ala)	GAT (Asp)	GAC (Asp)	AAT (Asn)	AAT (Asn)	GTA (Val)	AAT (Asn)	GCT (Ala)
	AGA (Arg)	TTG (Leu)	AAC (Asn)	ACT (Thr)	GCA (Ala)	Ata (Ile)	GCT (Ala)	GGT (Gly)	TAT (Tyr)	AAC (Asn)	GAT (Asp)	GAT (Asp)	ATA (Ile)	AGT (Ser)	GGT (Gly)
	AAT (Asn)											GAA (Glu)			
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2a 297A300D	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2b 297A300D	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Ser	Gly

## 2.2.2. Građa genoma

Genom virusa sastoji se od približno 5000 nukleotida te sadrži dva velika otvorena okvira čitanja (*eng. open reading frames, ORF*). Prvi otvoreni okvir čitanja se nalazi na 3' kraju te kodira nestrukturalne proteine NS1 i NS2, a drugi otvoreni okvir čitanja se nalazi na 5' kraju te kodira strukturalne virusne proteine VP1 i VP2 (Slika 4.) (MUZYCZKA i BERNIS, 2001.).

**Slika 4.** Položaji otvorenih okvira čitanja u u genomu CPV-2.



## 2.3. Taksonomija i klasifikacija

Parvovirusi se javljaju u različitim životinjskih vrsta, čovjeka i kukaca, te uzrokuju različitu kliničku sliku ovisno o svojim biološkim svojstvima i tropizmu. Pripadaju porodici *Parvoviridae* koja obuhvaća dvije podporodice: podporodicu *Parvovirinae*, koja se odnosi na rodove koji se javljaju u kralježnjaka i podporodicu *Densovirinae* koja se odnosi na kukce. Rodovi su razvrstani na temelju molekularnih značajki virusa te je tako podporodica *Parvovirinae* razvrstana u pet rodova: *Protoparvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* i *Bocavirus* (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Pseći parvovirus-2 pripada rodu *Protoparvovirus* te kao podskupina zajedno s mačjim panleukopenija virusom (*eng. feline panleukopenia virus, FPV*) spada u skupinu *Carnivore protoparvovirus 1* (ICTV, virus taxonomy, 2016.).

## 2.4. Tenacitet

Parvovirusi su izrazito stabilni u okolišu, ne reagiraju na promjenu pH i temperature te su otporni na većinu dezinficijensa (MUZYCYCKA i BERNIS, 2001.). U okolišu zahvaljujući svojoj otpornosti može preživjeti i do godinu dana (NANDI i KUMAR, 2010.).

## 2.5. Proširenost

Pseći parvovirus-2 proširen je diljem svijeta, s različitom zastupljenošću podtipova, tako je CPV-2a najviše zastupljen u Aziji (KANG i sur., 2008.; OSHIMA i sur., 2008) i Australiji (MEERS i sur., 2007.), CPV-2b i CPV-2c su zastupljeni u Sjevernoj Americi (HONG i sur., 2007.; KAPIL i sur., 2007.), CPV-2c u Europi (DECARO i sur., 2007a; DECARO i sur., 2011.) i u Južnoj Americi (PEREZ i sur., 2007.; CALDERON i sur., 2009.), s izuzetkom Brazila gdje je uglavnom zastupljen CPV-2a (CASTRO i sur., 2011.; PINTO i sur., 2012.).

## 2.6. Epizootiologija

Parvovirusna infekcija pasa je izrazito kontagiozna virusna zarazna bolest (APPEL i sur., 1979.) kod koje najvažniji izvor infekcije predstavlja feces inficirane životinje (BLACK i sur., 1979.). Ulazna vrata infekcije predstavlja oronazalna sluznica te se većina infekcija javlja kao rezultat izravnog kontakta zdrave životinje s predmetima i okolinom onečišćenom fecesom inficirane životinje. Osim navedenoga, uzročnik se može prenositi mehanički na ljudima, opremom, insektima i glodavcima (GREEN i DECARO, 2011.). Za infekciju CPV-2 u prirodnim uvjetima primljivi su domaći psi (*Canis familiaris*), kojot (*Canis latrans*), kolumbijski divlji pas (*Speothos venaticus*), vuk (*Canis lupus*), grivasti vuk (*Chrysocyon brachyurus*), šumska lisica (*Cerdocyon thous*), te većina ostalih životinja iz porodice *Canidae*. Poznato je da u prirodnim i pokusnim uvjetima CPV-2a i CPV-2b također mogu uzrokovati infekcije u mačaka (MOCHIZUKI i sur., 1996.; TRUYEN i sur., 1996.). Pseći parvovirus 2 ima tropizam prema stanicama koje se brzo dijele, te tako razara stanice crijevnih kripti i limfatično tkivo, ali se može proširiti i na sva ostala tkiva (POLLOCK, 1982.) uključujući mozak (DECARO i sur., 2009.). Najteži se klinički znakovi javljaju u mlađih pasa u kojih postoji endoparazitarna infestacija ili bakterijska infekcija probavnog sustava. U prijemljivih životinja smrtnost može biti vrlo visoka. Parvovirusna infekcija pasa se može javiti u pasa svih pasmina, dobi i spola, iako se najčešće javlja u pasa između šest tjedana i šest mjeseci starosti. Prema nekim istraživanjima postoji pasminska predispozicija te se navodi da će rottweiler, doberman pinč, labrador retriever, staffordski terijer, njemački ovčar i aljaški malamut znatno češće oboljeti u odnosu na neke druge pasmine (GREEN i DECARO, 2011.).

## **2.7. Patogeneza**

Virus ulazi u organizam preko oronazalne sluznice, nakon čega se umnaža u limfatičnom tkivu orofarinksa, mezenterijalnim limfnim čvorovima i timusu. Nakon početnog umnažanja, unutar jednog do pet dana poslije infekcije, CPV-2 se krvlju širi po organizmu te dospjeva u kripte tankog crijeva, i inficira epitel cijelog probavnog sustava (GREEN i DECARO, 2011.). Kod zdravih životinja epitelne stanice crijeva u fiziološkim uvjetima nastaju iz germinativnog epitela Lieberkühnovih kriпти, a zatim migriraju prema vrhu crijevnih resica gdje vrše apsorpciju hranjivih tvari iz crijeva (PARRISH, 1995.). Pseći parvovirus 2 se umnaža u germinativnom epitelu uzrokujući razaranje i kolaps epitela te posljedično dolazi do skraćivanja crijevnih resica koje više nisu u mogućnosti apsorbirati hranjive tvari te dolazi do pojave proljeva (NANDI i KUMAR, 2010.). Osim toga CPV-2 razara prekursore cirkulirajućih leukocita i limfatičnog tkiva te u teškim slučajevima infekcije dolazi do pojave neutropenije i limfopenije (POLLOCK, 1982.).

## **2.8. Klinička slika**

Kod prirodne infekcije inkubacija CPV-2 traje sedam do četrnaest dana, a kod pokusne četiri do pet dana. Infekcija zahvaća prvenstveno probavni sustav, koštanu srž i miokard, iako mogu biti zahvaćeni i koža i živčani sustav. Također se mogu pojaviti sekundarne bakterijske infekcije i tromboza (GREEN i DECARO, 2011.).

Težina kliničke slike ovisi o dobi, pasmini te prethodnom stresu i stanju imunskog sustava životinje. Iako kod starijih životinja bolest može proći asimptomatski, najteži oblici bolesti javljaju se u štenadi do 12 tjedana starosti. Tako mlade životinje nemaju u potpunosti razvijen imunski sustav, a stanice u većini tkiva se još uvijek brzo dijele. Rani klinički znakovi bolesti su depresija, gubitak apetita, povraćanje, povišena tjelesna temperatura i proljev (NANDI i KUMAR, 2010.). Proljev je vodenast, žučkasto-sive boje s primjesama krvi (FLETCHER i sur., 1979.). Miokarditis je danas poprilično rijetko kliničko očitovanje bolesti jer su štenad, zahvaljujući proširenoj vakcinaciji zaštićeni maternalnim protutijelima u vrijeme kada se stanice miokarda brzo dijele (LI i HUMM, 2014.). Kao učestali krvni nalaz koji prati parvovirusnu infekciju je leukopenija (DECCARO i sur., 2005a.). Mortalitet može biti i do 70% u štenaca, dok u odraslih iznosi manje od 1% (GREEN i DECARO, 2011.).

## **2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz**

Patoanatomske promjene koje se mogu naći kod pasa inficiranih CPV-2 virusom mogu varirati od blage upale do teškog difuznog hemoragičnog enteritisa. U lumenu želuca i crijeva

prisutan je tamni, ponekad krvavi vodenasti sadržaj. Makroskopska oštećenja uzrokovana CPV-2 virusom su ograničena isključivo na sluznicu jejunuma i ileuma, koja je zadebljana i djelomično promijenjene boje (ROBINSON i sur., 1980.). U blažim oblicima bolesti oštećenja nastala umnažanjem parvovirusa u probavnom sustavu teško je razlikovati od oštećenja koji se mogu naći kod enteritisa neke druge etiologije. Limfni čvorovi u grudnom košu i abdomenu su povećani i edematozni. Nekrotične promjene vidljive su na Peyerovim pločama, mezenterijalnim limfnim čvorovima, timusu i slezeni (MEUNIER i sur., 1985; GREEN i DECCARO, 2011.). U pasa kod kojih se razvila septikemija može se naći edem pluća ili alveolitis (TURK i sur., 1990.). Ukoliko dođe do razvoja upalnih promjena na srčanom mišiću vidljive su blijede pruge po miokardu, i cijelo srce je prošireno (WALDVOGEL i sur., 1991.). Patohistološki u crijevima nalazimo nekrozu epitela Lieberkühnovih kripti tankog crijeva (GREEN i DECARO, 2011.) te intranuklearne uklopine u epitelnim stanicama prednjih dijelova probavnog sustava. (MATSUI i sur., 1993.). Nadalje na srčanom mišiću vidljiv je negnojni miokarditis s multifokalnom infiltracijom limfocita i plazma stanica. Unutar srčanih mišićnih vlakana mikroskopski se nalaze bazofilne virusne uklopine (WALDVOGEL i sur., 1991.).

## **2.10. Dijagnostika**

Objektivna dijagnostika parvovirusne infekcije pasa zasniva se na dokazu protutijela u serumu ili uzročnika u fecesu, jer klinička slika i osnovne laboratorijske pretrage mogu samo pobuditi sumnju na parvovirozu pasa, ali ne i dati konačnu dijagnozu. Hemaglutinacija je relativno brza i jednostavna metoda koja se temelji na svojstvu parvovirusa da uzrokuju aglutinaciju eritrocita, a serumska protutijela inhibiraju vezanje virusa za eritrocite. Dokaz prisustva visokog titra protutijela potvrđuje dijagnozu bolesti (GREEN i DECARO, 2011.). Metoda je osjetljiva, ali slabo specifična (DAHIYA i sur., 2004.).

Dokaz uzročnika moguć je elektronskom mikroskopijom kao i imunohistokemijski u izmetu i oštećenim tkivima. Za izolaciju u kulturi stanica uzima se izmet ili strugotina lezija u jejunumu i ileumu. U kulturi stanica virus u roku pet dana stvara intranuklearne uklopine (GREEN i DECARO, 2011.). Imunoenzimni test je serološka metoda kojom se dokazuje virus u izmetu oboljele životinje. Metoda je relativno osjetljiva i specifična za uzročnika. Testovi se izvode jednostavno i brzo, relativno su jeftini te se najviše koriste u kliničkim uvjetim (WANNER i sur., 2003.).

Danas se za dokaz CPV-2 virusa sve više upotrebljavaju molekularne metode koje se zasnivaju na lančanoj reakciji polimerazom (PCR, *eng. polymerase chain reaction*) (MOCHIZUKI i sur., 1993b; KUMAR i sur, 2010.). Osim izrazite osjetljivosti PCR metoda omogućuje i razlikovanje pojedinih podtipova virusa (PEREIRA i sur, 2000.). Metoda PCR u stvarnom vremenu (*real time* -PCR, *eng. real time polymerase chain reaction*) omogućava dokaz svega nekoliko čestica virusa u uzorku uz istovremeno određivanje podtipa virusa, što je osobito važno u pasa koji su cijepljeni unutar nekoliko tjedana od pojave kliničkih znakova bolesti. Ovakvi psi izlučuju cijepni soj koji je klasičnim PCR-om nemoguće razlikovati od terenskih sojeva (DECARO i sur., 2005b.; NANDI i sur., 2009.).

### **2.11. Liječenje**

Liječenje se uglavnom svodi na simptomatsku i potpurnu terapiju. Osnovni cilj simptomatskog liječenja je nadoknada tekućine, uspostavljanje ravnoteže elektrolita i suzbijanje sekundarnih bakterijskih infekcija. Nadoknada tekućine je jedan od najvažnijih aspekata kliničkog liječenja i treba se davati kontinuirano dok traju povraćanje i proljev. Primjenom odgovarajuće intravenske tekućinske terapije potrebno je korigirati hipoglikemiju i hipokalemiju (GREEN i DECARO, 2011.). Antimikrobni pripravci se primjenjuju kako bi spriječili širenje bakterija u krv te posljedično razvoj sepse. Najučinkovitija antibiotska terapija se svodi na kombinaciju penicilina i aminoglikozida. Osim navedenog koriste se antiemetici, od kojih su se najučinkovitijim pokazali antagonisti serotoninskih receptora (MACINTIRE i SMITH-CARR, 1997.). Za zaštitu sluznice želuca u upotrebi su antagonisti H-2 receptora kao što su ranitidin, cimetidin i famotidin.

### **2.12. Imunoprofilaksa**

Prvu zaštitu koju štenad dobiva su maternalna protutijela koje majka prenosi preko placente i kolostruma u prvim danima života. Dobivena pasivna imunost opada sa starošću štenadi od šestog tjedna njihove starosti. Titar protutijela koji se smatra zaštitnim iznosi 1:80, dok se titar protutijela 1:40 više ne smatra zaštitnim i interferira s cjepivom koje sadrži pseći CPV-2 što predstavlja osnovni uzrok nepotpune zaštite nakon cijepljenja (POLLOCK i CARMICHAEL, 1982.; NANDI i KUMAR, 2010.). Istraživanja su pokazala da je cijepljenje najuspješnije kada je titar protutijela manji od 1:10 (SCHULTZ, 2006.). Danas su na tržištu dostupna različita komercijalna cjepiva protiv parvovirusne infekcije pasa, inaktivirana i atenuirana, te monovalentna i polivalentna koja za sada sadrže isključivo originalni podtip CPV-2 (FREISL

i sur., 2017.). Kod štenadi nepoznatog imunosnog statusa prema preporuci WSAVA VGG grupe (*eng. World Small Animal Veterinary Association Vaccination Guidelines Group*) (DAY i sur, 2016.) cijepljenje je potrebno započeti između osmog i devetog tjedna starosti životinje. Nakon izvršene primovakcinacije cijepljeni protokol nastavlja se dvokratnom aplikacijom vakcine u razmaku od tri do četiri tjedna od primovakcinacije. Važno je naglasiti da štene treba primiti treće cjepivo najkasnije u dobi od 16 tjedana. Nakon pravilno obavljenog trokrotnog cijepljenja u prvoj godini života, životinju je potrebno nadocijepiti nakon godinu dana ili kada navršše jednu godinu. Ukoliko je navedeni cijepljeni protokol proveden prema opisanoj preporuci, smatra se da je životinja razvila dobru imunost te ju je potrebno nadocijepiti svake tri godine. Zaštita koju pruža imunoprofilaksa je vrlo dobra, uz minimalni broj cijepljenih nezgoda. Nedavno je dokazano da se u pasa oboljelih od parvovirusne infekcije neposredno nakon cijepljenja radi o infekciji terenskim sojevima, a ne povratku virulencije cijepljenog soja (DECARO i sur., 2007b.). Posebna zabrinutost postoji o razini zaštite koju pružaju cjepiva koja sadrže podtip CPV-2 od infekcije ostalim podtipovima parvovirusa 2 pasa (HERNÁNDEZ-BLANCO i CATALA-LÓPEZ, 2015.). Iako postoje studije koje su pokazale da protutijela nastala nakon cijepljenja CPV-2 podtipom virusa daju niži neutralizirajući titar za preostala tri podtipa virusa, ovo cjepivo je uspješno štitilo psa od infekcije i najnovijim CPV-2c podtipom u eksperimentalnim uvjetima (SIEDEK i sur., 2011.).

### **2.13. Javno zdravstvo**

U dostupnoj literaturi nije opisan prijenos psećeg parvovirusa-2 na čovjeka niti obratno, te samim time nema značaj po pitanju javnog zdravstva.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorkovanje

U ovom istraživanju ukupno je sakupljeno i obrađeno 747 uzoraka fecesa i obrisaka rektuma pasa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te područnih veterinarskih organizacija s područja grada Zagreba u razdoblju od 1. lipnja 2015. do 31. ožujka 2017. godine. Životinje obuhvaćene ovim istraživanjem pokazivale su kliničke znakove akutnog gastroenteritisa. Za daljnju statističku obradu od navedenog broja korišteni su podaci o 228 pasa za koje su bili dostupni podaci iz nacionala, anamneze te kliničkog pregleda i tijeka liječenja. (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Podaci o životinjama korišteni za statističku obradu

Podaci o vlasniku	Nacional	Anamneza	Klinički pregled	Tijek liječenja	Ishod bolesti
Privatna osoba/Sklonište	Dob	Razlog dolaska	Proljev	Trajanje hospitalizacije	
	Spol	Podaci o cijepljenju	Krvavi proljev	Hematološke pretrage	
	Pasmina		Povraćanje		
			Imunokromatografski test		
			Lančana reakcija polimerazom		

Uzorci su do obrade bili pohranjeni na  $-80^{\circ}$  C u Virusološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika

Za molekularni dokaz prisutnosti CPV-2 u uzorku korištena je ukupna DNK izdvojena iz uzoraka fecesa ili obrisaka rektuma. Dokazivanje prisustva CPV-2 načinjeno je primjenom lančane reakcije polimerazom umnažajući odsječak genoma virusa.

##### 3.2.1. Priprema uzoraka

U biozaštitnoj komori uzorci su se razrijedili puferiranom solnom otopinom u omjeru 1:10, nakon čega se dobivena otopina kratkotrajno promiješala na tresilici te centrifugirala na 3500 okretaja u trajanju od 10 minuta.

##### 3.2.2. Izdvajanje virusne DNK

Za izdvajanje ukupne DNK iz uzoraka korišten je komercijalni komplet QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Njemačka) sukladno uputama proizvođača.

Komplet QIAamp DNA Mini Kit sadržava:

QIAamp kolona za centrifugiranje	50
	komada
plastične epruvete zapremine 2 ml	150
	komada
puferska otopina AL	12 ml
puferska otopina ATL	10 ml
puferska otopina AW1 (koncentrirana)	19 ml
puferska otopina AW2 (koncentrirana)	13 ml
puferska otopina AE	22 ml
proteinaza K	1,25 ml

### 3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Izvođenje PCR metode načinjeno je uz korištenje sljedećih reagensa:

- voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- reakcijski pufer 10x koncentriran
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 25 mM dNTP
- uzvodna početnica 10 μM (Hfor)
- nizvodna početnica 10 μM (555rev)
- Taq Platinum 5u/μl (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)



**Tablica 3.** Početnice za umnažanje odsječka genoma CPV-2 korištene u izvođenju PCR metode (BUONAVOGLIA i sur., 2001.).

Oznaka početnice	Smjer vezanja	Nukleotidni slijed 5' → 3'
Hfor	Uzvodna početnica	CAGGTGATGAATTTGCTACA
555rev	Nizvodna početnica	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA

**Tablica 4 .** Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode

Reagens	Količina za 1 uzorak	Konačna koncentracija
Voda	15,1 µl	/
Pufer 10x	2,5µl	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75µl	1,5 mM
dNTP (10 mM)	2,0 µl	200 µM
Početnica Hfor (10 µM)	1,0 µl	0,5 µM
Početnica 555R (10 µM)	1,0 µl	0,5 µM
Taq Platinum 5u /µl	0,15 µl	1,25 U

Reakcijska smjesa je pripravljena u količini od 25µl po uzorku. U PCR Eppendorf epruvetice stavljeno je 22,5 µl reakcijske smjese, a potom 2,5 µl izdvojene DNK pojedinog uzorka. Pripremljeni uzorci stavljeni su u PCR-uređaj programiran za sljedeći temperaturni program:

95 °C	5 min	
94 °C	15 s	} 40 x
55 °C	1 min	
72 °C	1:15 min	
72 °C	7 min	

hlađenje pri + 4°C

### **3.2.4. Elektroforeza u gelu**

Uspješnost prepisivanja i umnažanja ciljnih dijela virusnog genoma pretraživanih uzoraka provjerena je elektroforezom u gelu. Osnovni princip elektroforeznog razdvajanja zasnovan je na činjenici da čestice različitog naboja i različite mase, pod utjecajem električnog polja, za isto vrijeme prelaze različite puteve u agaroznom gelu.

#### Pribor, oprema i reagensi:

- analitička vaga (PB153) (Mettler Toledo, Kusunacht, Švicarska)
- sustav za detekciju DNA pod ultraljubičastim svjetlom (Gel Doc 200) (BioRad, Richmond, SAD)
- kalup za gel
- češljic za tvorbu jažica u gelu
- mikrovalna pećnica (MO 17 MW) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- sustav za provođenje elektroforeze (Scie-Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- izvor električne struje (CS-300V) (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- marker DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- agaroz (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TAE pufer
- pufer za nanošenje uzoraka u gel (10X *Blue Juice gel loading dye*) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- uređaj za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio-Rad, Hercules, California, SAD)
- boja za gel (Nucleic Acid Gel stain) (Lonza, Basel, Switzerland)

#### **3.2.4.1. Priprema TAE pufera**

##### Reagensi za pripremu 50x koncentriranog TAE pufera:

93,5 g EDTA (EDTA Disodium salt) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

242 g Tris (TRIZMA baza) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

57 ml ledene octene kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Prvo se priprema 0,5 M otopina EDTA na način da se 93,5 g EDTA staviti u 400 ml redestilirane vode uz podešavanje pH na 8,0 dodavanjem kristala NaOH i dopuni redestiliranom vodom do volumena od 500 ml. Nakon toga 242 g Tris baze otopi se u 750 ml redestilirane vode te se dodaju 57 ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) nakon čega se dopuni redestiliranom vodom do 1000 ml.

Kako je za pripremu gela za elektroforezu potreban TAE pufer koncentracije 1x iz načinjene otopine potrebnu koncentraciju pripremimo miješanjem 10 ml TAE pufera koncentriranog 50x i 490 ml destilirane vode.

#### **3.2.4.2. Pripremanje gela**

U Erlenmayerovu tikvicu odvagane se 0,5 g agaroze za elektroforezu te se dodaje 50 ml pufera TAE 1x koncentriranog. Agarosa se otapala zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom 3 minute dok otopina nije postala potpuno bistra. U otopinu ohlađenu na 50°C dodano je 0,25 µl boje za gel. Otopina je potom razlivena u kalup za gel na kojem su prethodno postavljene vanjske stranice radi sprečavanja razlijevanja gela i umetnut češljic za udubljivanje jažica. Nakon hlađenja i polimerizacije gela češljic je izvađen, a vanjske stranice skinute s rubova kalupa. Postolja s gelom stavljeno je u kadicu za elektroforezu tako da je dio gela s jažicama bio okrenut prema katodi, a kadica za elektroforezu bila je napunjena TAE-puferom koji je u potpunosti prekrivao gel.

#### **3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze**

Na parafinskom filmu pomiješalo se 3 µl boje za nanošenje (*engl. 10x Blue Juice loading dye*) te 4 µl umnožene DNK, za svaki pretraživani uzorak. Mikropipetom uzorci su nanoseni po rednom broju u jažice, a u posljednje tri jažice na gelu, nanosene su pozitivna i negativna kontrola te DNA marker (DNA Ladder 100 pb, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD). Bazen s gelom uređaja za elektroforezu, napunjen TAE puferom, bio je zatvoren poklopcem i spojen na istosmjernu električnu struju napona 90 V i jačine 450 A. Sam postupak elektroforeze trajao je 40 minuta. Po završetku elektroforeze gel je izvađen, a rezultati očitani pomoću UV transiluminatora i snimljeni uređajem za snimanje gelova. Veličina dobivenih odsječaka mogla se procijeniti usporedbom položaja dobivenog fragmenta s markerom.

Uspješan dokaz uzročnika PCR metodom podrazumijevao je prisutnost umnoženog fragmenata odgovarajuće veličine.

### 3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a

Nukleotidni slijed umnoženog odsječka virusne DNK određivan je u svrhu molekularne tipizacije i filogenetske analize psećeg parvovirusa na području RH. Slijed 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. Daljnju analizu DNK slijedova radilo se pomoću računalnog programa MEGA 7 (KUMAR i sur., 2016.). Pomoću navedenog programa načinjeno je višestruko sravnjivanje DNK slijedova i ustanovljavanje postojećih polimorfnih mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka. Koristeći metodu najveće vjerojatnosti (*engl. maximum likelihood, ML*) nukleotidni slijedovi dobivenih odsječaka virusne DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim slijedovima iz NCBI banke gena za pojedine podtipove CPV-2 u cilju izrade filogenetskog stabla.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (data analysis software system), version 12. software.dell.com. (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike načinjena je i statistička analiza rezultata. Kvalitativne varijable, učestalosti, obrađene su hi-kvadrat testom. S obzirom da podaci o trajanju hospitalizacije pojedinih životinja nisu pratili normalnu raspodjelu analizirani su Mann-Whitney U testom, dok su podaci o broju leukocita, koji su pratili normalnu raspodjelu, analizirani jednosmjernom analizom varijance (ANOVA). Osjetljivost i specifičnost brzog imunokromatografskog testa, u odnosu na PCR metodu, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost izračunate su prema formulama prikazanim tablično (Tablica 5.)

**Tablica 5.** Formule za izračunavanje osnovnih vrijednosti koje opisuju dijagnostički test

$$osjetljivost = \frac{stvarno\ pozitivni}{stvarno\ pozitivni + lažno\ negativni}$$
$$specifičnost = \frac{stvarno\ negativni}{stvarno\ negativni + lažno\ pozitivni}$$
$$PPV = \frac{osjetljivost * prevalencija}{osjetljivost * prevalencija + (1 - specifičnost) * (1 - prevalencija)}$$
$$NPV = \frac{specifičnost * (1 - prevalencija)}{(1 - osjetljivost) * prevalencija + specifičnost * (1 - prevalencija)}$$

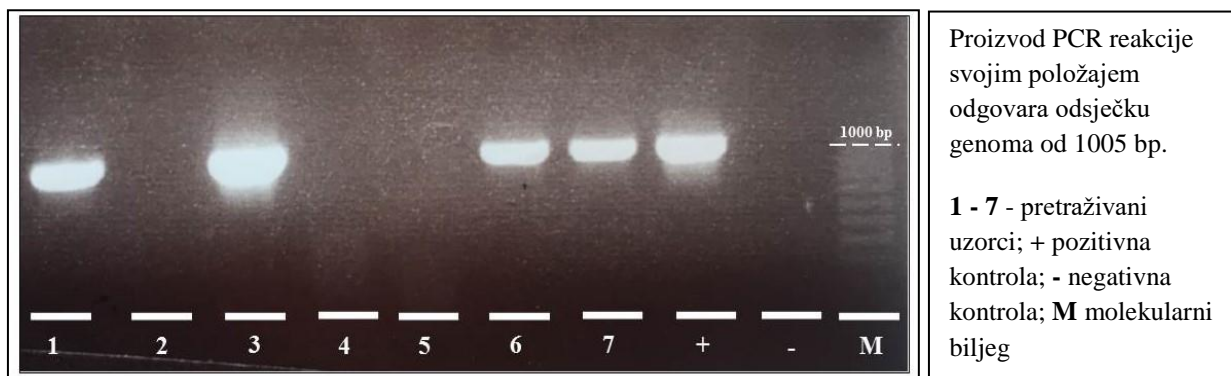
PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost

## 4. REZULTATI

Ovim istraživanjem bilo je obuhvaćeno 228 životinja. Iz anamnestičkih podataka bilo je vidljivo da je od ovog broja pasa 161 jedinka bila u posjedu privatnih vlasnika, dok je njih 67 bilo u vlasništvu skloništa za nezbrinute životinje. Navedeni psi mogu se razvrstati u 49 različitih pasmina od kojih je najviše bilo mješanaca (N=115), malteza (N=19), te labrador retrievera (N=9), dok je u ostalih pasmina bila zastupljenost do četiri jedinke. Muškog spola bilo je 123 pasa, a ženskog spola je sveukupno bilo 105. Prilikom prvog pregleda ili tijekom bolničkog liječenja povraćanje je uočeno u 159, proljev u 171, a krvavi proljev u 91 pasa. U 34 životinje su uočeni klinički znakovi koji govore u prilog oboljenja dišnog sustava..

Od ukupnog broja uzoraka prisutnost CPV-2 dokazana je u 108 uzoraka. Uspješan dokaz uzročnika PCR metodom podrazumijevao je prisutnost umnoženog fragmenata veličine 1005 pb na gelu (Slika 5.). Dobiveni proizvodi PCR metode poslani su na pročišćavanje i određivanje nukleotidnog slijeda. Nukleotidni slijed nije bilo moguće odrediti u 18 proizvoda PCR reakcije unatoč nekoliko ponavljanja cijelog postupka i dobivanja nedvojbeno pozitivnog rezultata.

**Slika 5.** Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku.



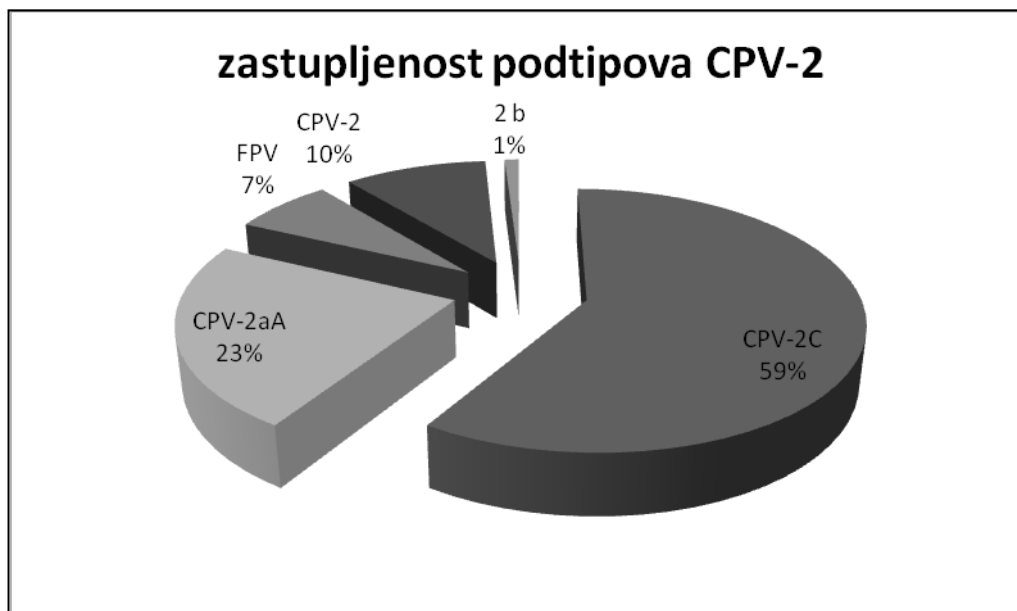
Koristeći računalni program (MEGA7) dobiveni rezultati očitavanja nukleotidnih slijedova, nakon višestrukog sravnjivanja, prevedeni su u odsječke duljine 913 bp, koji odgovaraju odsječku virusnog genoma od položaja 3620 do 4533.

U prvom koraku dobiveni slijed nukleotida preveden je u odgovarajući aminokiselinski slijed koji je uspoređen s aminokiselinskim slijedovima referentnih slijedova nukleotida preuzetim iz NBCI banke gena (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Razlike u aminokiselinskom sastavu VP2 proteina različitih podtipova CPV-2

Pristupni broj	Tip virusa	Aminokiselinski sastav VP2 proteina											
		80	87	93	101	103	297	300	305	323	426	564	568
	<b>FPV</b>	K	M	K	I/T	V	S	A	D	D	N	N	A
M38245	<b>CPV-2</b>	R	M	N	I	A	S	A	D	N	N	S	G
DQ340404	<b>CPV-2a</b>	R	L	N	T	A	S	G	Y	N	N	S	G
JX475246	CPV-2a 300D	R	L	N	T	A	S	D	Y	N	N	S	G
DQ340411	CPV-2a 297A	R	L	N	T	A	A	G	Y	N	N	S	G
EF599098	CPV-2a 297A300D	R	L	N	T	A	A	D	Y	N	N	S	G
DQ340409	<b>CPV-2b</b>	R	L	N	T	A	S	G	Y	N	D	S	G
KF373568	CPV-2b 297A	R	L	N	T	A	A	G	Y	N	D	S	G
JX475261	CPV-2b 297A300D	R	L	N	T	A	A	D	Y	N	D	S	G
FJ005196	<b>CPV-2c</b>	R	L	N	T	A	A	G	Y	N	E	S	G

Rezultati navedene usporedbe prikazani su u grafikonu 1 i vidljivo je da je predominantni podtip CPV-2 virusa bio CPV-2c (59%). U 23% uzoraka dokazan je podtip CPV-2a, a u 10% uzoraka CPV-2 soj. U jednom uzorku dokazan je podtip CPV-2b, a u sedam uzoraka dokazana je prisutnost virusa mačje panleukopenije (7%).



**Grafikon 1.** Zastupljenost pojedinih podtipova CPV-2 na području grada Zagreba

## Genetska raznolikost

Nakon određivanja tipa CPV-2 načinjena je međusobna usporedba nukleotidnih slijedova odsječka virusnog genoma dobivenih iz pozitivnih uzoraka. Na ovaj način ustanovljena je potpuna podudarnost slijedova iz većeg broja uzoraka, kako onih kod kojih je dokazana prisutnost virusa podtipa CPV-2c tako i onih kod kojih je dokazana prisutnost podtipa CPV-2a (Tablica 7 i Tablica 8.).

**Tablica 7.** Podtip CPV-2a - uzorci s potpuno istovjetnim nukleotidnim slijedovima

<b>CPV-2aA</b>			
skupina 1	skupina 2	skupina 3	skupina 4
GE 343/16	GE 8/16	GE 33/16	V-11-17
GE 10/17	GE 437/16	GE 34/16	GE 311/16
GE 15/15	GE 207/16	GE 8/15	GE 227/16
	GE 317/16		

**Tablica 8.** Podtip CPV-2c - uzorci s potpuno istovjetnim nukleotidnim slijedovima

<b>CPV-2c</b>						
skupina 1	skupina 2	skupina 3	skupina 4	skupina 5	skupina 6	skupina 7
GE 103/15	GE 102/15	GE 349/16	GE 301/16	V-12-17	GE 14/17	GE 6/17
GE 5/16	GE 89/17	GE 341/16	GE 316/16	GE 46/17	GE 39/17	GE 33/17
GE 200/16	GE 90/17		GE 323/16			
GE 39/17			GE 324/16			
GE 60/17			GE 325/16			
GE 54/15			GE 356/16			
GE 73/15			GE 436/16			
GE 99/15			GE 4/15			
GE 309/16			GE 29/15			
GE 30/17			GE 192/16			
GE 34/17			GE 9/15			
GE 212/16			GE 199/16			
GE 40/17			GE 232/16			
GE 103/15			GE 242/16			
GE 46/17			V-17-17			
GE 14/17			GE 31/17			
V-14-17			GE 35/17			
GE 6/17			GE 55/17			
GE 131/16			V-7-17			
			GE 203/16			
			GE 210/16			
			GE 241/16			
			GE 296/16			

Sljedeći korak u analizi nukleotidnih slijedova bilo je ustanoviti prisutnost mutacija koje bi bile svojstvene sojevima CPV-2 koji cirkuliraju na području RH usporedbom istih sa slijedovima izvornih izolata pojedinih podtipova CPV-2. U svih uzoraka, u kojih je dokazana prisutnost CPV-2a, osim jednog (Slika 6.) dokazana je izmjena A3675G te u većine uzoraka izmjena adenina u guanin na poziciji 4496 (Slika 7.).

**Slika 6.** Izmjena A3675G u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba

NAZIV UZORKA	A	C	T	A	T	G	T	A	C	C	A	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	G	A	G	G	T	A	T	G	A	A	A	A			
✓ 1. CPV2a_1980	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 2. 2a297A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 3. 2a300D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 4. 2a297A300D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 5. 4/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 6. 6/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 7. Group2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 8. Group1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 9. 106/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 10. V-11/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 11. Group3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 12. 63/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 13. 71/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 14. 134/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 15. Group4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 16. 78/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 17. 108/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 18. 452/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 19. 110/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
✓ 20. V-35-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A

**Slika 7.** Izmjena A4496G u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba

NAZIV UZORKA	A	T	C	T	G	A	A	G	G	A	G	G	T	A	C	T	A	A	C	T	T	T	G	G	T	T	A	T								
✓ 1. CPV2a_1980	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 2. 2a297A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 3. 2a300D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	
✓ 4. 2a297A300D	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 5. 4/16	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 6. 6/16	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 7. Group2	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 8. Group1	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 9. 106/15	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 10. V-11/17	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 11. Group3	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 12. 63/17	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 13. 71/15	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 14. 134/16	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 15. Group4	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 16. 78/15	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 17. 108/15	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 18. 452/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	
✓ 19. 110/16	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 20. V-35-17	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

U tri slijeda zabilježene su izmjene na poziciji 3756 i 3757 (Slika 8.).



**Slika 8.** Izmjene nukleotida na poziciji 3756 i 3757 u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba

NAZIV UZORKA	C	T	A	T	A	T	A	C	T
<input checked="" type="checkbox"/> 1. CPV2a_1980	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 2. 2a297A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 3. 2a300D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 2a297A300D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 5. 4/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 6. 6/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 7. Group2	.	A	T	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 8. Group1	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 9. 106/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 10. V-11/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 11. Group3	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 12. 63/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 13. 71/15	.	A	T	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 14. 134/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 15. Group4	.	A	T	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 16. 78/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 17. 108/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 18. 452/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 19. 110/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 20. V-35-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Nukleotidni slijedovi CPV-2c virusa iz ovog istraživanja pokazali su veliku učestalost mutacije na položaju 3903 (Slika 9.) dok su se na položajima 3888 i 3878 (Slika 9.) javljale u manjem broju slučajeva. U sedam slijedova ustanovljena je mutacija i na položaju 4061 (Slika 10.) dok je na položaju 4193 (Slika 11.) izmjena citozina u timin dokazana u svim slijedovima koji pripadaju podtipu CPV-2c.

**Slika 9.** Izmjene nukleotida na poziciji 3878, 3888 i 3903 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba

Name	C	G	C	A	A	A	C	A	G	A	T	G	A	A	A	A	T	C	A	A	G	C	A	G	C	A	G	A	T
<input checked="" type="checkbox"/> 1. Germ_2c_1 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 2. Germ_2c_2 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 3. Ita_2c_1 (2000)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 270/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 5. 127/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 6. 112/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 7. 237/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 8. G7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 9. 69/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 10. G6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 11. G5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 12. 266/16	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 13. 291/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 14. G4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 15. G3	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 16. G2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<input checked="" type="checkbox"/> 17. G1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 18. 107/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A

**Slika 10.** Izmjene nukleotida na poziciji 4061 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba

<input checked="" type="checkbox"/> Name	A	C	A	G	A	A	G	A	T	A	A	T	G	T	A
<input checked="" type="checkbox"/> 1. Germ_2c_1 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 2. Germ_2c_2 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 3. Ita_2c_1 (2000)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 270/16	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 5. 127/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 6. 112/17	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 7. 237/16	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 8. G7	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 9. 69/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 10. G6	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 11. G5	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 12. 266/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 13. 291/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 14. G4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 15. G3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 16. G2	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 17. G1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 18. 107/15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Slika 11.** Izmjene nukleotida na poziciji 4193 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba

<input checked="" type="checkbox"/> Name	A	T	C	T	G	G	G	A	T	A	A	A	G	A	A	T	T	T
<input checked="" type="checkbox"/> 1. Germ_2c_1 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 2. Germ_2c_2 (1997)	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 3. Ita_2c_1 (2000)	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 270/16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 5. 127/16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 6. 112/17	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 7. 237/16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 8. G7	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 9. 69/17	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 10. G6	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 11. G5	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 12. 266/16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 13. 291/16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 14. G4	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 15. G3	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 16. G2	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 17. G1	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<input checked="" type="checkbox"/> 18. 107/15	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Prevođenjem navedenih nukleotidnih slijedova u odgovarajući slijed aminokiselina svi slijedovi podtipa CPV-2a imali su izmjenu serinskog ostatka u alaninski na položaju 297, a tri izmjenu tirozina u izoleucin na položaju 324 (Slika 12.).

**Slika 12.** Izmjene aminokiselina na poziciji 297 i 324 u CPV-2a sojeva s područja grada Zagreba

NOZNAKA UZORKA	Q	S	E	G	G	T	N	F	G	Y	I	G	V	Q	Q	D	K	R	R	G	V	T	Q	M	G	N	T	N	Y	I	T	
✓ 1. CPV2a_1980	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 2. 2a297A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 3. 2a300D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 4. 2a297A300D	.	A	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 5. 4/16	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 6. 6/16	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 7. Group2	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	
✓ 8. Group1	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 9. 106/15	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 10. V-11/17	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 11. Group3	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 12. 63/17	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 13. 71/15	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	
✓ 14. 134/16	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 15. Group4	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	
✓ 16. 78/15	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 17. 108/15	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 18. 452/16	.	.	.	A	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 19. 110/16	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
✓ 20. V-35-17	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Aminokiselinski slijed uzročnika iz skupine CPV-2c pokazivao je u velikom broju slučajeva izmjenu aspartata u asparagin na mjestu 373 (Slika 13.).

**Slika 13.** Izmjene aminokiselina na poziciji 373 u CPV-2c sojeva s područja grada Zagreba

✓ Name	D	E	N	Q	A	A	D	G	D	P	R
✓ 1. Germ_2c_1 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 2. Germ_2c_2 (1997)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 3. Ita_2c_1 (2000)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 4. 270/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 5. 127/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 6. 112/17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 7. 237/16	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 8. G7	.	K	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 9. 69/17	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 10. G6	.	K	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 11. G5	.	K	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 12. 266/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 13. 291/16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 14. G4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 15. G3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 16. G2	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.
✓ 17. G1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 18. 107/15	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.

Ostale aminokiselinske izmjene u slijedovima aminokiselina CPV-2 iz ovog istraživanja bile su sporadične.

Koristeći metodu najveće vjerojatnosti (*engl. maximum likelihood, ML*) nukleotidni slijedovi dobivenih odsječaka virusne DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim slijedovima iz banke gena (NCBI) dobivenih u istraživanjima drugih autora. Pristupni broj, zemlja podrijetla kao i godina iz koje datira predmetni virus predstavljena je tablično (Tablica 9., 10., 11.).

**Tablica 9.** Popis pristupnih brojeva nukleotidnih slijedova referentnih sojeva CPV-2

	<b>Pristupni broj</b>	<b>Podtip virusa</b>	<b>Godina izolacije</b>
	M38245	CPV-2	1978.
	DQ340404	CPV-2a	1980.
	M24003	CPV-2a	1984.
	DQ340411	CPV-2a-297A	1990.
	JX475246	CPV-2a-300D	2010.
	EF599098	CPV-2a297A300D	2005.
Nobivac	FJ197846	CPV-2 cjepni soj	
Eurican	FJ197847	CPV-2 cjepni soj	

**Tablica 10.** Oznaka i pristupni broj nukleotidnih slijedova CPV-2a korištenih za filogenetsku analizu

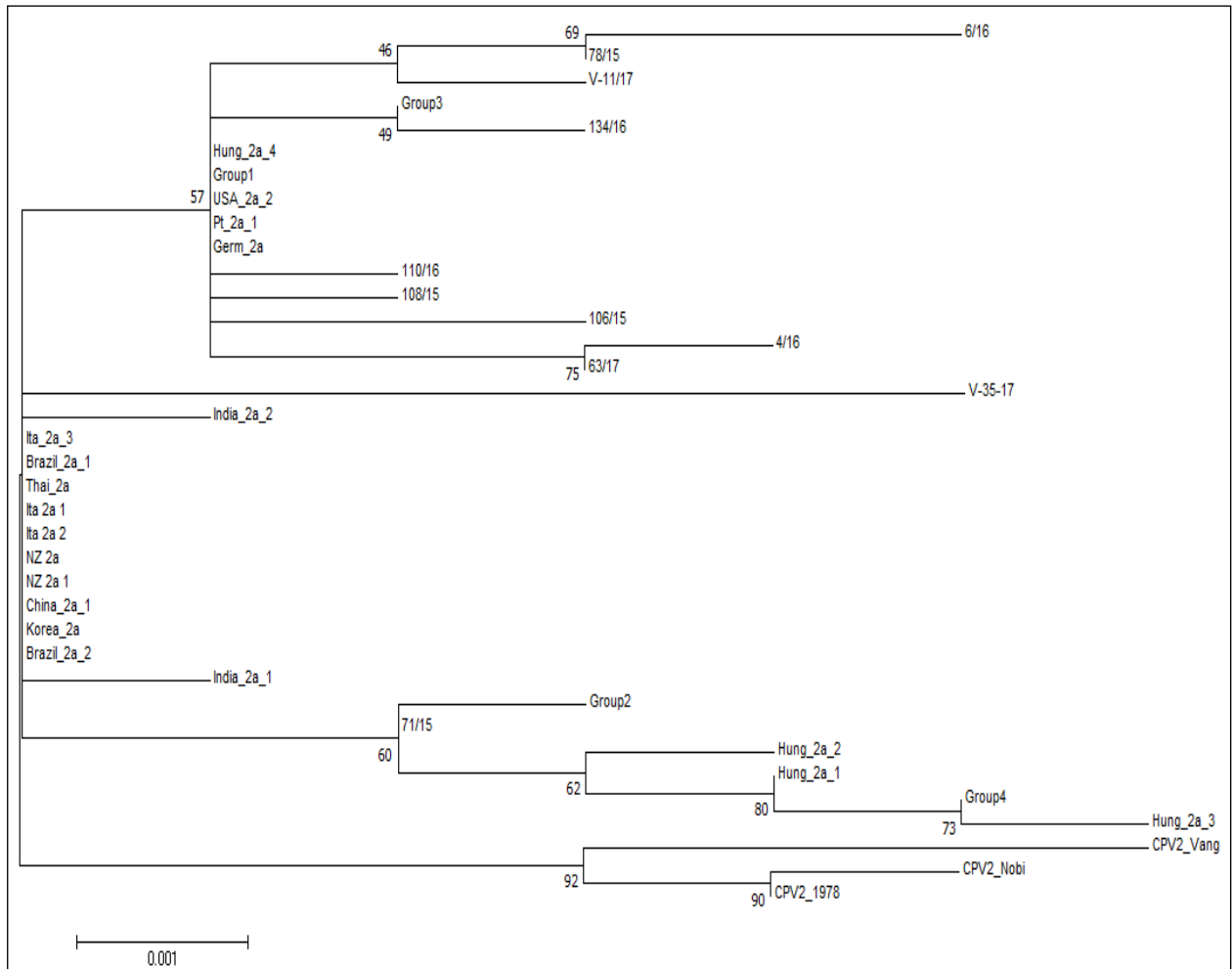
<b>Oznaka</b>	<b>Pristupni broj</b>	<b>Podtip virusa</b>	<b>Zemlja podrijetla</b>	<b>Godina izolacije</b>
Ita 2a 1	KF373587	CPV-2a	Italija	2007.
Ita 2a 2	KF373582	CPV-2a	Italija	2006.
Ita 2a 3	KF3737571	CPV-2a	Italija	1999.
NZ 2a	KP881669	CPV-2a	Novi Zeland	2009.
NZ 2a 1	KP881664	CPV-2a	Novi Zeland	2009.
China 2a 1	KF803615	CPV-2a	Kina	2011.
Thai 2a	FJ869126	CPV-2a	Tajland	2008.
Korea 2a	EF599096	CPV-2a	Koreja	2005.
Brazil 2a 1	DQ340416	CPV-2a	Brazil	1991.
Brazil 2a 2	DQ340421	CPV-2a	Brazil	1992.
India 2a 1	KU866406	CPV-2a	Indija	2008.
India 2a 2	DQ182622	CPV-2a	Indija	2004.
Pt 2a 1	KR559891	CPV-2a	Portugal	2012.
Germ 2a	A7742935	CPV-2a	Njemačka	1995.
Hung 2a 1	KF539789	CPV-2a	Mađarska	2014.
Hung 2a 2	KF539790	CPV-2a	Mađarska	2014.
Hung 2a 3	KF539791	CPV-2a	Mađarska	2014.
Hung 2a 4	KF539792	CPV-2a	Mađarska	2014.
Ita 2a 4	FJ005252	CPV-2a	Italija	2002.
Ita 2a 5	FJ005253	CPV-2a	Italija	2005.
Ita 2a 6	FJ005256	CPV-2a	Italija	2008.
Ita 2a 7	FJ005257	CPV-2a	Italija	2008.
Ita 2a 8	FJ005258	CPV-2a	Italija	2008.
Hung 2a 5	KF539793	CPV-2a	Mađarska	2014.
Hung 2a 6	KF539794	CPV-2a	Mađarska	2014.
Brazil 2a 3	DQ340433	CPV-2a	Brazil	2000.
Brazil 2a 4	DQ340434	CPV-2a	Brazil	2000.

**Tablica 11.** Oznaka i pristupni broj nukleotidnih slijedova CPV-2c korištenih za filogenetsku analizu

<b>Oznaka</b>	<b>Pristupni broj</b>	<b>Podtip virusa</b>	<b>Zemlja podrijetla</b>	<b>Godina izolacije</b>
CRO 2c 1	KP859575	CPV-2c	Hrvatska	2015.
CRO 2c 2	KP859574	CPV-2c	Hrvatska	2015.
CRO 2c 3	KP859576	CPV-2c	Hrvatska	2015.
CRO 2c 4	KP859577	CPV-2c	Hrvatska	2015.
PT 2c 1	KT275252	CPV-2c	Portugal	2012.
PT 2c 2	KR559893	CPV-2c	Portugal	2012.
CRO 2c 5	KP859578	CPV-2c	Hrvatska	2015.
Pt 2c 3	KT275255	CPV-2c	Portugal	2014.
Germ2c 1	FJ005196	CPV-2c	Njemačka	1997.
Germ2c 2	FJ005197	CPV-2c	Njemačka	1997.
Germ2c 3	FJ005203	CPV-2c	Njemačka	1997.
Germ2c 4	FJ005204	CPV-2c	Njemačka	1999.
Ita 2c 1	FJ005195	CPV-2c	Italija	2000.
Ita 2c 2	FJ222821	CPV-2c	Italija	2000.
Ita 2c 3	FJ005205	CPV-2c	Italija	2004.
Ita 2c 4	FJ005208	CPV-2c	Italija	2004.
Spain 2c 1	FJ005214	CPV-2c	Španjolska	2006.
Ita 2c 5	FJ005215	CPV-2c	Italija	2006.
Ita 2c 6	FJ005233	CPV-2c	Italija	2007.
USA 2c 1	FJ005235	CPV-2c	USA	2007.
USA 2c 2	FJ005236	CPV-2c	USA	2007.
Span 2c 2	FJ005246	CPV-2c	Španjolska	2008.
Belg 2c	FJ005247	CPV-2c	Belgija	2008.
Ita 2c 7	FJ005251	CPV-2c	Italija	2008.
Ita 2c 8	FJ005249	CPV-2c	Italija	2008.
URU 2c 1	EF375482	CPV-2c	Urugvaj	2007.
ARG 2c 1	FJ349322	CPV-2c	Argentina	2008.
Greece 2c	GQ865519	CPV-2c	Grčka	2009.
FR 2c	DQ0025974	CPV-2c	Francuska	2005.
Ec 2c 1	KF149962	CPV-2c	Equador	2012.
Ec 2c 2	KF149984	CPV-2c	Equador	2012.

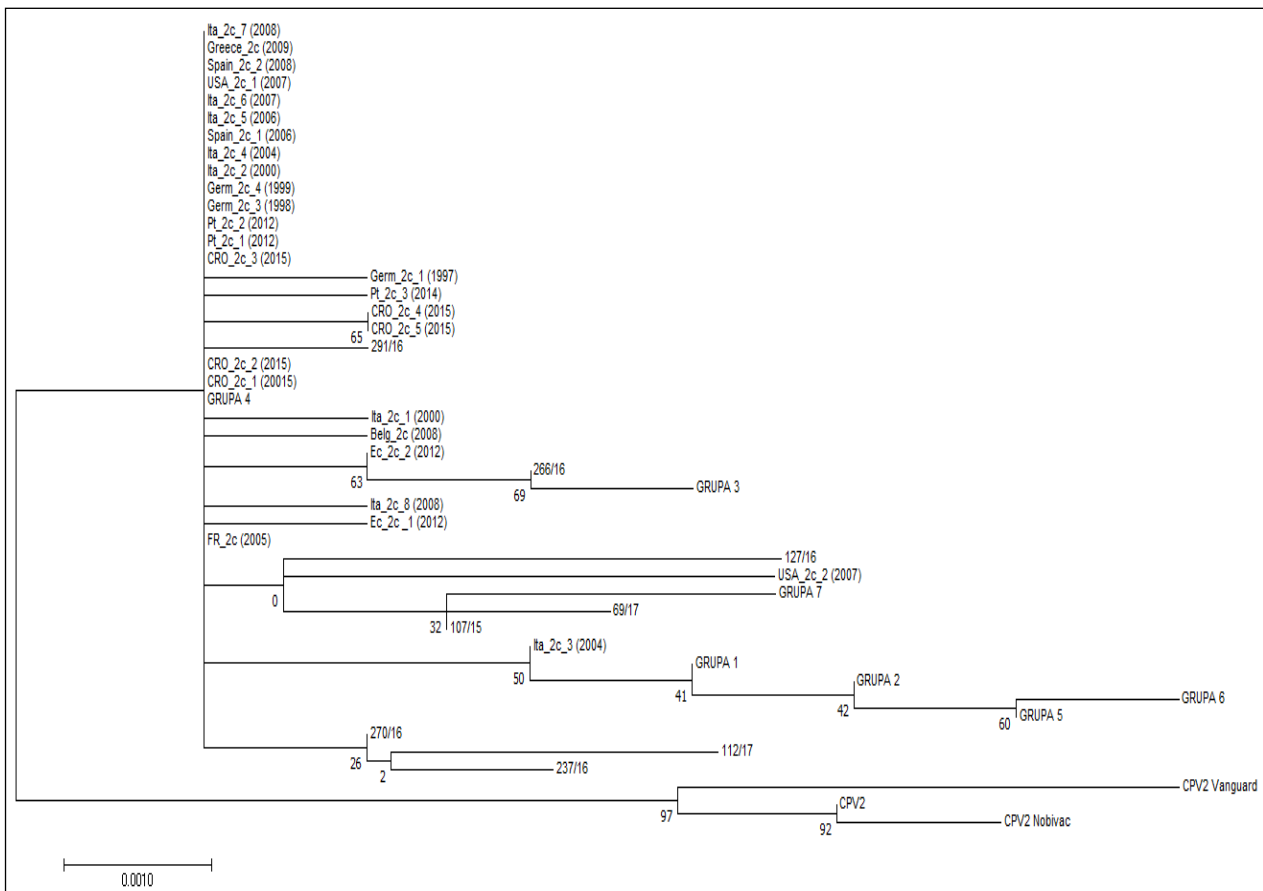
Filogenetska stabla su zbog broja nukleotidnih slijedova uključenih u analizu načinjena odvojeno za podtip CPV-2a i CPV-2c (Slika 14 i slika 15).

**Slika 14.** Filogenetsko stablo CPV-2a sojeva



Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem ML metode koristeći 3-parametarski Tamura model (TAMURA, 1992.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-1527,54). Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu. Kao vanjska grupa za potrebe postavljanja izvorišta stabla korišteni su cijepni sojevi CPV-2

**Slika 15.** Filogenetsko stablo CPV-2c sojeva



Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem ML metode koristeći 3-parametarski Tamura model (TAMURA, 1992.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-1545,62). Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Gama distribucija je korištena za korekciju evolucijski promjena pojedinih nukleotida. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu. Kao vanjska grupa za potrebe postavljanja izvorišta stabla korišteni su cijepni sojevi CPV-2

Statističkom analizom ustanovljeno je da prevalencija parvoviroze u pasa s kliničkim znakovima akutnog gastroenteritisa iznosi 47,37%. Usporedbom učestalosti infekcije CPV-2 u mješanaca i čistokrvnih pasa uočeno je da mješanci češće oboljevaju od parvovirusne infekcije ( $p=0,016$ ). Kada su uspoređeni samo psi koji se nalaze u posjedu privatnih vlasnika mješanci nisu imali povećan rizik od oboljevanja ( $p=0,63$ ) jer su psi koji se nalaze u skloništim za nezbrinute životinje češće oboljevali ( $p<0,001$ ). Zbog nedovoljnog broja jedinki za pojedine pasmine, te nedostupnosti podataka o zastupljenosti pojedinih pasmina u općoj populaciji pasa na području grada Zagreba, nije bilo moguće odrediti pasminsku predispoziciju niti za nastanak akutnog gastroenteritisa niti oboljevanja od parvovirusne

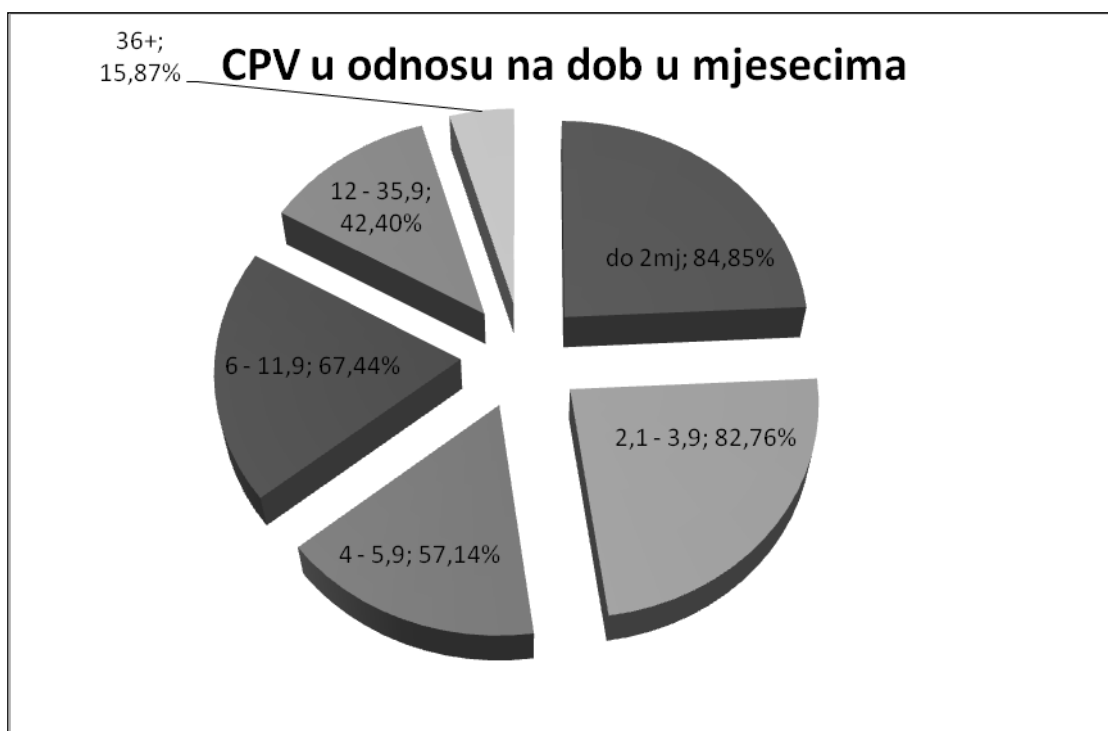


infekcije pasa. Dobna predispozicija je izrazita ( $p < 0,001$ ). U nešto više od 80% slučajeva pasa mlađih od dva mjeseca te u gotovo 80% pasa starosti između dva i četiri mjeseca koji su dovedeni na liječenje zbog kliničke slike akutnog gastroenteritisa uzrok navedenih znakova bila je infekcija CPV-2 (Grafikon 2.). Zanimljivo je da su i psi u dobnoj skupini između šest i dvanaest mjeseci također skupina povećanog rizika za oboljevanje od parvoviroze pasa (Grafikon 2.). Nije ustanovljena nikakva spolna predispozicija niti za nastanak akutnog gastroenteritisa niti za infekciju CPV-2 virusom.

Nije utvrđena statistička značajnost razlike u razvijanju proljeva, povraćanja niti povraćanja i proljeva između pasa s akutnim gastroenteritisom koji su inficirani odnosno onih koji nisu inficirani CPV-2. Zanimljivo je da pojava krvavog proljeva nije govorila u prilog infekcije parvovirusom ( $p = 0,81$ ).

Ishod liječenja je statistički izrazito značajno bio povoljniji u skupini pasa s akutnim gastroenteritisom u kojih nije dokazan CPV-2 ( $p < 0,001$ ). Preživljavanje je imalo tendenciju biti veće u pasa koji su prethodno bili cijepljeni protiv parvovirusa-2 pasa ( $p = 0,066$ ), međutim zbog nedostupnosti podataka nije se moglo cijepljene pse dalje razvrstati ovisno o vremenu cijepljenja. Od rezultata laboratorijskih pretraga korištena je vrijednost broja leukocita u krvi gdje je dokazano da pacijenti inficirani CPV-2 imaju statistički značajno niži broj leukocita od pasa s akutnim gastroenteritisom koji je nastupio iz drugih razloga ( $p = 0,002$ ). Usporedbom rezultata PCR metode i komercijalnog brzog imunokromatografskog testa ustanovljena je osjetljivost brzog testa od 56,67% te specifičnost od 100%. Pozitivna prediktivna vrijednost brzog testa bila je 100% dok je negativna prediktivna vrijednost, korigirana s obzirom na prevalenciju, bila u pasa s akutnim gastroenteritisom 54,86%. Nije ustanovljena razlika osjetljivosti brzog imunokromatografskog testa s obzirom na podtip virusa ( $p = 0,6$ ).

Nije ustanovljen statistički značajan utjecaj tipa virusa na preživljavanje niti duljinu hospitalizacije pasa. Tip virusa isto nije imao utjecaja na pojavu kliničkih znakova povraćanja, proljeva niti krvavog proljeva te nije bilo razlike u smanjenju broja leukocita. Isto tako nije dokazano da se pojedini podtip CPV-2 virusa češće javljao u cijepljenih životinja. Ono što je bilo značajno je da se tip CPV-2a puno češće javljao u pasa u posjedu privatnih vlasnika dok se tip CPV-2c češće javljao u životinja iz skloništa za napuštene životinje ( $p = 0,0095$ ).



**Grafikon 2.** Prevalencija infekcije CPV-2 u različitim dobnim skupinama

Nije ustanovljen statistički značajan utjecaj tipa virusa na preživljavanje niti duljinu hospitalizacije pasa. Tip virusa isto nije imao utjecaja na pojavu kliničkih znakova povraćanja, proljeva niti krvavog proljeva te nije bilo razlike u smanjenju broja leukocita. Isto tako nije dokazano da se pojedini podtip CPV-2 virusa češće javljao u cijepjenih životinja. Ono što je bilo značajno je da se tip CPV-2a puno češće javljao u pasa u posjedu privatnih vlasnika dok se tip CPV-2c češće javljao u pasa iz skloništa za napuštene životinje ( $p=0,0095$ ).

## 5. RASPRAVA

Parvovirusna infekcija pasa je vjerojatno jedna od najčešćih zaraznih bolesti pasa i zasigurno najčešći uzrok akutnog gastroenteritisa u ove vrste domaćih životinja (CARMICHAEL i BINN, 1981.; GREEN i DECARO, 2011.). Iako je bolest prvi put opisana na području RH davne 1980. godine (CVETNIĆ, 1980.) do danas ne postoje podaci o opsežnijem istraživanju epizootologije parvovirusne infekcije pasa u našoj zemlji što daje posebnu vrijednost ovom radu. Istraživanje provedeno za potrebe izrade ovog diplomskog rada daje prve opsežne podatke o proširenosti, čimbenicima rizika, kliničkom očitovanju te molekularnoj epizootologiji infekcije parvovirusom pasa na području grada Zagreba. Na osnovu podataka prikupljenih za potrebe ovog istraživanja, od 228 pasa sa znakovima akutnog gastroenteritisa s područja grada Zagreba, parvovirusna infekcija je dokazana, PCR metodom, u njih 108 što daje vrijednost prevalencije bolesti od 47,37%. Vrijednost prevalencije je u skladu s podacima iz drugih europskih zemalja gdje se prevalencija CPV-2 u pasa sa znakovima akutnog gastroenteritisa kretala od 27,66% u Španjolskoj do 71,43% u Njemačkoj (DECARO i sur., 2011.) što neosporno govori u prilog parvovirusne infekcije pasa kao najvažnijeg uzroka akutnog oboljenja probavnog sustava u pasa u gradu Zagrebu, a vjerojatno i u Hrvatskoj.

Određivanjem nukleotidnog slijeda umnoženog odsječka genoma CPV-2 virusa i filogenetskom analizom dobivenih podataka bilo je nadalje moguće svrstati pojedine sojeve CPV-2 virusa u podtipove te dobiti uvid u molekularnu epizootologiju infekcije parvovirusom pasa u Hrvatskoj. Danas postoje neosporni podaci da je jedna od osnovnih značajki CPV-2 virusa velika izmjenjivost njegovog genetskog materijala, koja inače nije uobičajena u DNK virusa. Učestalost od  $10^{-4}$  izmjena po mjestu godišnje je vrijednost koja više odgovara RNK virusima (SHACKELTON i sur., 2005.). U ovom istraživanju od ukupno 118 uzoraka koji su PCR metodom dali pozitivan rezultat nukleotidni slijed je bilo moguće pouzdano odrediti za njih 100. Na osnovu aminokiselinskog slijeda ustanovljeno je da je i Hrvatska jedna od zemalja u kojoj je CPV-2c najzastupljeniji podtip virusa, čineći 59,0% od ukupnog broja dobivenih slijedova, a za njim slijed podtip CPV-2a s 23,0% te na kraju podtip CPV-2b sa svega 1%. Slična zastupljenost pojedinih podtipova virusa dokazana je i u Italiji, Njemačkoj, Španjolskoj i Portugalu (DECARO i sur., 2007a.; DECARO i sur., 2011.; MIRANDA i sur., 2016.). Vrlo je zanimljivo da je u nama susjednoj Mađarskoj dokazana isključivo prisutnost podtipa CPV-2a, dok se recimo u Ujedinjenom Kraljevstvu, Bugarskoj i

Grčkoj podtip CPV-2c samo sporadično javlja (DECARO i sur., 2007b.; NTAFIS i sur., 2010.; FILIPOV i sur., 2011.; CSAGOLA i sur., 2014.). Iako se Mađarska nalazi u našoj neposrednoj blizini, razlika u zastupljenosti pojedinih podtipova CPV-2 virusa govori da je epizootiologija parvovirusne infekcije pasa uvelike uvjetovana specifičnim epizootiološkim čimbenicima koji vladaju na području jedne države. Značaj epizootioloških čimbenika koji djeluju na određenom području naglašava i podatak o zastupljenosti pojedinih podtipova u različitim populacijama pasa obuhvaćenih ovim istraživanjem. Podtip CPV-2c se dokazivao češće u napuštenih pasa dok se u pasa u posjedu privatnih vlasnika češće javljao podtip CPV-2a. Nažalost prikupljeni podaci nisu bili dovoljni za nedvosmisleno razjašnjavanje uočene razlike, a nisu pronađeni niti slični podaci u istraživanjima drugih autora. Veći udio pasa u skloništima za nezbrinute životinje koji su inficirani CPV-2c podtipom može biti posljedica cirkuliranja soja virusa u nastambama skloništa, gdje je provođenje mjera opće profilakse zaraznih bolesti otežano zbog velikog broja novih životinja koje svakodnevno pristižu. Ovu tezu nije bilo moguće potvrditi jer nije postojala jasna vremenska povezanost istovjetnih sojeva, na razini nukleotida, koja bi govorila u prilog enzootije. Moguće objašnjenje leži u ustaljenoj mutaciji koja je prisutna u svih opisanih sojeva CPV-2a u ovom istraživanju osim jednoga. Sojevi virusa CPV-2a iz ovog istraživanja imaju aminokiselinsku izmjenu Ser297Ala. Iako su ove izmjene opisane i u drugim državama (ZHOU i sur., 2017.), ovo je prvi slučaj da na jednom području ova aminokiselinska izmjena postane potpuno ustaljena neovisno o godini izolacije, pasmini i drugim praćenim epizootiološkim čimbenicima. Kako je aminokiselina na 297. mjestu sastavni dio trnastog izdanka na čije se epitope stvaraju protutijela u zaraženoj životinji (TSAO i sur., 1991.; PARKER i PARRISH, 1997.; TRUYEN, 2006.), moguće da je upravo ova izmjena dovoljna za barem djelomično izbjegavanje imunskog odgovora u cijepljenih životinja, jer se pretpostavka, da je populacija pasa u posjedu privatnih vlasnika više procijepljena u odnosu na pse u vlasništvu skloništa za napuštene životinje, čini sasvim osnovanom. Slično je i s izmjenom na 373. mjestu u sojeva CPV-2c podtipa, gdje je u većine izolata dokazanih provedbom ovog istraživanja došlo do izmjene aspartata u asparagin. I ovaj aminokiselinski ostatak ima ulogu u građi epitopa kapside virusa te izbjegavanja imunskog odgovora (TSAO i sur., 1991.), ali nije dokazana neka povezanost ove mutacije s istraživanim epizootiološkim čimbenicima. Neovisno o podtipu virusa, aminokiselinske izmjene su bile zabilježene i na drugim mjestima u VP2 proteinu i to uglavnom na mjestima koja se nalaze u sastavu površinskog izdanka kapside virusa. Ovo istraživanje je ponovno potvrdilo da je imunološki pritisak domaćina osnova u

usmjeravanju evolucije CPV-2 koji je i doveo do emergencije pojedinih podtipova virusa (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). U prilog zajedničkih čimbenika koji djeluju na evoluciju CPV-2 govori i pogled na filogenetska stabla (Slika 14., Slika 15.) načinjena prilikom filogenijske analize dobivenih nukleotidnih slijedova. Neovisno o podtipu virusa sojevi virusa s područja grada Zagreba dijele stopostotnu sličnost sa sojevima virusa iz drugih država, čak i država s drugih kontinenata, kao i onih izoliranih dvadesetak godina ranije.

Kako je već napomenuto da ne postoje podaci o većem sustavnom istraživanju na području parvovirusne infekcije pasa u RH iz anamnestičkih podataka, koji su bili dostupni, pokušalo se doći do čimbenika dispozicije u populaciji pasa na području grada Zagreba te se pokušalo ustanoviti da li postoje razlike u epizootiologiji pojedinih podtipova virusa. Za razliku od ranijih istraživanja (GLICKMAN i sur., 1985.; HOUSTON i sur., 1996.) čistokrvni psi nisu imali povećan rizik od oboljevanja, već mješanci ( $p=0,016$ ). Ovo je vjerojatno posljedica toga što je većina pasa koji se nalaze u skloništima za nezbrinute životinje križane pasmine, a oni daleko češće oboljevaju od parvovirusne infekcije ( $p<0,001$ ). Kada su pasminski uspoređeni samo psi koji su u posjedu privatnih vlasnika nije uočena značajna razlika u riziku od oboljevanja što je u skladu s novijim istraživanjima (GODSALL i sur., 2010.). Osim već spomenute razlike u zastupljenosti CPV-2a i CPV-2c u pasa u posjedu privatnih vlasnika i napuštenih pasa, nije ustanovljena razlika u pasminskoj dispoziciji za pojedini podtip CPV-2 virusa.

Postoji opće prihvaćeno mišljenje da je parvovirusna infekcija bolest štenadi i mladih pasa što je i potvrđeno u istraživanjima provedenim u većem broju država (HOUSTON i sur., 1996., GREEN i DECARO, 2011.). Najugroženije dobne skupine u ovom istraživanju su bili štenad u dobi do četiri mjeseca kod kojih je CPV-2 bio odgovoran za oko 80% slučajeva akutnog gastroenteritisa. Zanimljivo je da se parvovirusna infekcija pasa statistički značajno češće javlja u pasa u dobi od šest mjeseci do godine dana (64,29%) nego u pasa dobi od četiri do šest mjeseci (50,0%). Ovo je vjerojatno posljedica ograničenog kontakta pasa mlađih od šest mjeseci s drugim psima mada bi za potpuno razjašnjenje ovog opažanja trebalo prikupiti još podataka, osobito o cijepljenom statusu životinja, koji je kod značajnog broja životinja u ovom istraživanju nedostajao. Uobičajena je pojava da se nakon završenog trokrotnog cijepljenja protiv zaraznih bolesti, multivalentnim cjepivom, u dobi od tri do četiri mjeseca štenci cijepi protiv bjesnoće nakon mjesec dana. U tom razdoblju vlasnicima pasa se savjetuje smanjiti kontakt s drugim psima na najmanju moguću mjeru, što bi upravo odgovaralo porastu pojave

bolesti u pasa nakon šest mjeseci starosti. Nije dokazana povećana zastupljenost pojedinog podtipa virusa ovisno o dobi pasa.

Nagli nastup profuznog, smrdljivog, krvavog proljeva, kojem prethodi povraćanje, uvriježeno se smatra klasičnom kliničkom slikom parvovirusne infekcije u pasa (GREEN i DECARO, 2011.). Ovo istraživanje nije pokazalo da se pojava proljeva i/ili povraćanja razlikuje u pasa s akutnim gastroenteritisom u kojih je dokazana infekcija CPV-2 i onih bez. Ono što je izrazito zanimljivo prisutnost krvavog proljeva, što se kod mladih pasa smatra gotovo sigurnim dokazom parvovirusne infekcije, nije bila povezana s molekularnim dokazom CPV-2 ( $p=0,81$ ). Po drugoj strani broj leukocita je bio značajno smanjen u pasa inficiranih CPV-2 kao i pozitivan ishod liječenja. Iako je opće poznato u stručnoj javnosti da parvovirusnu infekciju pasa prati leukopenija, ona se ne javlja uvijek, odnosno može biti prikrivena porastom broja neutrofila uslijed istovremene bakterijske infekcije (GREEN i DECARO, 2011.), međutim leukopenija kod prvog kliničkog pregleda se pokazala kao dobar pokazatelj koji govori u prilog parvovirusne infekcije. S kliničkog stajališta izrazito je bitno naglasiti da je preživljavanje oboljelih od parvovirusne infekcije značajno niže (74,11%), u odnosu na one koji razviju kliničke znakove akutnog gastroenteritisa iz nekog drugog razloga (95,11%) ( $p<0,0001$ ). Utjecaj pojedinih podtipova virusa na kliničko očitovanje bolesti, trajanje i ishod liječenja istraživano je u svega nekoliko radova (GODSALL i sur., 2010.; MARKOVICH i sur., 2012.). Niti ovo istraživanje nije pokazalo da podtip virusa ima ikakav utjecaj na pojavu pojedinih kliničkih znakova, težinu kliničke slike kao niti na preživljavanje.

Imunoprofilaksa ima značaj ne samo u zaštiti životinje od bolesti već i u preživljavanju oboljelih životinja. Necijepljene životinje očekivano daleko češće oboljevaju od parvovirusne infekcije, ali cijepljene životinje imaju tendenciju većeg preživljavanja, neovisno o vremenu i dobi cijepljenja ( $p=0,066$ ) što je bitno za kliničare kod davanja prognoze vlasnicima. Nažalost statistička obrada je u ovom slučaju mogla ići samo do razine dokazivanja tendencije, jer za veliki broj životinja nema dostupnih podataka o točnom protokolu cijepljenja. U zadnjih desetak godina među veterinarima praktičarima vlada mišljenje da je sve češća pojava parvovirusne infekcije pasa u životinja koje su prošle potpuni cijepljeni protokol. U većine ovakvih pasa molekularnim metodama dokazana je infekcija CPV-2c podtipom virusa (DECARO i sur., 2008.; DECARO i sur., 2009.) te postoji zabrinutost u stručnoj javnosti u svezi razine zaštite koju pružaju komercijalno dostupna cjepiva koja mahom sadrže izvorni CPV-2 podtip. Ovo istraživanje nije pokazalo da se pojedini podtip virusa javlja češće u

cijepljenih životinja ( $p=0,5$ ), te se na osnovu ovih rezultata može reći da cjeviva daju dobru zaštitu i protiv infekcije CPV-2c podtipom što je i u skladu s drugim istraživanjima (SPIBEY i sur., 2008.; SIEDEK i sur., 2011.). Zanimljivo je da je cijepni soj virusa bio pronađen u 10 životinja. Nažalost za samo njih pet bilo je poznato vrijeme cijepljenja i to su bile životinje cijepljene unutar dva tjedna od nastupa kliničkih znakova. Od ukupnog broja životinja obuhvaćenih ovim istraživanjem, a koje su cijepljene unutar dva tjedna od prvog pregleda, (N=11) 45,45% izlučivalo je cijepni virus. Ovaj podatak govori o ograničenjima koje ima PCR metoda kao metoda izbora za dokaz parvovirusne infekcije pasa. Klasična PCR metoda ne može razlikovati cijepni od terenskog soja, bez određivanja nukleotidnog slijeda te stoga može dati lažno pozitivne rezultate (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). U ovom istraživanju, pet od 11 nedavno cijepljenih životinja, dalo je lažno pozitivan rezultat što je izrazito veliki broj te govori o potrebi izvođenja bolje metode molekularne dijagnostike parvovirusne infekcije pasa, kao što je recimo PCR metoda u stvarnom vremenu (DECARO i sur., 2006.; DECARO i sur., 2007b.).

Za veterinara praktičara ovo istraživanje daje još jedan vrlo važnu smjernicu, smjernicu u tumačenju rezultata imunokromatografskog testa. Brzi komercijalni kromatografski testovi su našli široku primjenu u kliničkoj praksi zbog svoje jednostavnosti izvođenja pretrage i brzog dobivanja rezultata uz razumnu cijenu. Ovi testovi služe za dokaz CPV-2 u izmetu oboljelog psa. Iako proizvođači navode da su osjetljivost i specifičnost ovog testa izrazito visoke, zbog izrazite sklonosti mutacijama CPV-2 već dugo postoji razumno pitanje kolika je pouzdanost ovih testova u terenskim uvjetima (KAPIL i sur., 2007; DECARO i sur., 2010.). Osjetljivost brzog imunokromatografskog testa bila je 56,67% a specifičnost 100%. Ova vrijednost osjetljivosti je znatno niža od vrijednosti koje navode proizvođači brzih testova za dokaz parvovirusne infekcije u pasa dostupnih u RH, osjetljivost preko 90%, ali i niža od vrijednosti koje navode drugi autori (DECARO i sur., 2010.). Za razliku od drugih radova, podaci dobiveni prikazanim istraživanjem govore o osjetljivosti imunokromatografskog testa u kliničkim uvjetima. Stoga je niža osjetljivost metode donekle i očekivana, a zasigurno iznimno značajna za veterinare praktičare. Čak i uz korekciju vrijednosti u odnosu na prevalenciju bolesti pozitivna prediktivna vrijednost testa je 100%, ali negativna je 54,86%, što govori da je gotovo pola životinja kod kojih je pretraga imunokromatografskim testom dala negativan rezultat ustvari inficirano CPV-2. Osim uvjeta izvođenja smanjena osjetljivost testa može biti i posljedica prisutnosti veće količine protutijela u lumenu crijeva koja

blokiraju virusne antigene, ali i antigenskih izmjena samog virusa (DECARO i sur., 2010., GREEN i DECARO, 2011.). Iako brzi testovi mogu dokazati i prisutnost FPV u uzorku izmeta (NEUERER i sur., 2008.), posredni dokazi su govorili da je smanjena osjetljivost posljedica nemogućnosti dostupnih komercijalnih testova da dokažu prisutnost CPV-2c podtipa (KAPIL i sur., 2007.). Međutim, ubrzo je dokazano da osjetljivost metode nije uvjetovana podtipom virusa (DECARO i sur., 2010.). Niti ovo istraživanje nije pokazalo da podtip virusa uvjetuje smanjenu osjetljivost metode ( $p=0,6$ ) već razloge treba tražiti u ograničenosti metode u kliničkim uvjetima izvođenja.

Zaključno, kao konačni dokaz izrazito složene epizootologije parvovirusne infekcije pasa, ovaj rad po prvi puta daje opis sedam nukleotidnih slijedova koji odgovaraju virusu panleukopenije mačaka. Do sada nije opisan niti jedan slučaj infekcije pasa virusom FPV na svijetu, niti je dokazan prijelaz međuvrsne barijere ovog virusa, osim jednog opisa akutnog gastroenteritisa u majmuna (YANG i sur., 2010.). Kako nukleotidni slijed umnožen početnicama korištenim u ovom radu ne daje uvid u aminokiselinski sastav dijela kapside koja je odgovorna za prepoznavanje staničnih receptora i određuje mogućnost inficiranja pojedine životinjske vrste, dobiveni rezultati nisu dostatni za detaljniju analizu. Međutim, rezultati zasigurno potvrđuju izrazitu složenost epizootologije ove bolesti uvjetovanu epizootiološkim značajkama koje vladaju na pojedinom području i izrazite kompleksnosti evolucije CPV-2. Za potpuno razjašnjavanje brojnih nepoznanica u oba navedena područja potrebno je više istraživanja nalik istraživanju opisanom u ovom radu kako bi se dobio bolji uvid u epizootologiju parvovirusne infekcije pasa i evoluciju CPV-2 kako na području Hrvatske tako i na svjetskoj razini.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Parvovirusna infekcija pasa je najznačajniji pojedinačni uzrok akutnog gastroenteritisa pasa na području grada Zagreba s prevalencijom od 47,37% u populaciji bolesnih pasa.
2. Na području grada Zagreba prisutna su sva tri poznata podtipa virusa, a najzastupljeniji su podtipovi CPV-2c (59%) i CPV-2a (23%).
3. Dokazane su aminokiselinske izmjene u kapsidi terenskih sojeva CPV-2 na mjestima 297 i 373 koje su ustaljene, a mogu utjecati na izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina.
4. Način držanja uvjetuje razlike u zastupljenosti pojedinih podtipova virusa i riziku od oboljenja koji je značajno viši u populaciji napuštenih pasa.
5. Najveća učestalost oboljenja od parvovirusne infekcije pasa je u prvoj godini života, s nešto smanjenim rizikom u dobi od četiri do šest mjeseci.
6. Određivanje podtipa infektivnog virusa nema klinički značaj, ali je izrazito bitno za praćenje epizootologije bolesti.
7. Imunoprofilaksa smanjuje rizik od infekcije CPV-2, neovisno o cijepnom i infektivnom podtipu virusa.
8. Brzi imunokromatografski testovi imaju izrazito nisku osjetljivost u kliničkim uvjetima izvođenja, te bi se svi negativni rezultati trebali potvrditi molekularnim metodama.
9. Ograničenja klasične metode lančane reakcije polimerazom naglašava potrebu za uvođenjem novih metoda koje bi omogućila razlikovanje cijepnog od terenskih sojeva.

## 7. LITERATURA

- ALLISON, A. B., D. J. KOHLER, A. ORTEGA, E. A. HOOVER, D. M. GROVE, E. C. HOLME, C. R. PARRISH (2014): Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. *PLoS Pathog.* 10, e1004475.
- APPEL, M. J., F. W. SCOTT, L. E. CARMICHAEL (1979): Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156-159.
- BLACK, J. W., M. A. HOLSCHER, H. S. POWELL, C. S. BYERLY (1979): Parvoviral enteritis and panleukopenia in dogs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 74, 47-50.
- BUONAVOGLIA, C., V. MARTELLA, A. PRATELLI, M. TEMPESTA, A. CAVALLI, D. BUONAVOGLIA, G. BOZZO, G. ELIA, N. DECARO, L. CARMICHAEL (2001): Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021-3025.
- CALDERON, M. G., N. MATTION, D. BUCAFUSCO, F. FOGEL, P. REMORINI, J. LA TORRE (2009): Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J. Virol. Methods.* 159, 141-145.
- CARMICHAEL, L. E., L. N. BINN (1981): New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25, 1-37.
- CARMICHAEL, L. E., D. H. SCHLAFER, A. HASHIMOTO (1994): Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 165-174.
- CASTRO, T. X., E. M. COSTA, J. P. LEITE, N. V. LABARTHE, R. C. CUBEL GARCIA (2011): Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 90, 336-340.
- CSÁGOLA, A., S. VARGA, M. LRINCZ, T. TUBOLY (2014): Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary. *Arch. Virol.* 159, 2441-2444.
- CVETNIĆ, S. (1980): Parvovirusna infekcija pasa. *Praxis vet.* 28, 163-167.
- DAHIYA, S. S., D. D. KULKARNI (2004): Optimization of haemagglutination test for the detection of canine Parvovirus infection. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 25, 119-220.
- DAY, M. J., M. C. HORZINEK, R. D. SCHULTZ, R. A. SQUIRES (2016): Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the

world small animal veterinary association (WSAVA). *J. Small Anim. Pract.* 57, E1-E45. doi: 10.1111/jsap.2\_12431.

DE YBANEZ, R. R., C. VELA, E. CORTES, I. SIMARRO, J. I. CASAL (1995): Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136, 174-175.

DECARO, N., M. CAMPOLO, C. DESARIO, G. ELIA, V. MARTELLA, E. LORUSSO, C. BUONAVOGLIA (2005a): Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals.* 33, 261-267.

DECARO, N., G. ELIA, V. MARTELLA, C. DESARIO, M. CAMPOLO, L. D. TRANI, E. TARSITANO, M. TEMPESTA, C. BUONAVOGLIA (2005b): A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19-28.

DECARO, N., V. MARTELLA, G. ELIA, C. DESARIO, M. CAMPOLO, D. BUONAVOGLIA, A.L. BELLACICCO, M. TEMPESTA, C. BUONAVOGLIA (2006): Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J. Virol. Methods.* 138, 10-16.

DECARO, N., C. DESARIO, D.D. ADDIE, V. MARTELLA, M.J. VIEIRA, G. ELIA, A. ZICOLA, C. DAVIS, G. THOMPSON, E. THIRY, U. TRUYEN, C. BUONAVOGLIA (2007a): Molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe. Emerg. Infect. Dis.* 13, 1222-1224.

DECARO, N., C. DESARIO, G. ELIA, M. CAMPOLO, A. LORUSSO, V. MARI, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2007b): Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine.* 25, 1161-1166.

DECARO, N., C. DESARIO, G. ELIA, V. MARTELLA, V. MARI, A. LAVAZZA, M. NARDI, C. BUONAVOGLIA (2008): Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125-130.

DECARO, N., F. CIRONE, C. DESARIO, G. ELIA, E. LORUSSO, M. L. COLAIANNI, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2009): Severe parvovirus in a 12- year old dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet. Rec.* 164, 593-595.

DECARO, N., C. DESARIO, M. J. BEALL, A. CAVALLI, M. CAMPOLO, A. A. DIMARCO, F. AMORISCO, M. L. COLAIANNI, C. BUONAVOGLIA (2010): Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet. J.* 184, 373-375.

DECARO, N., C. DESARIO, M. BILLI, V. MARI, G. ELIA, A. CAVALLI, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2011): Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet. J.* 187, 195-199.

- DECARO N., C. BUONAVOGLIA (2012): Canine parvovirus- A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1-12.
- FILIPOV, C., N. DECARO, C. DESARIO, F. AMORISCO, R. SCIARRETTA, C. BUONAVOGLIA (2011): Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 152-154.
- FLETCHER, K. C., A. K. EUGSTER, R. E. SCHMIDT, G. B. HUBBARD (1979): Parvovirus infection in maned wolves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 897-900.
- FREISL, M., S. SPECK, U. TRUYEN, S. REESE, A. L. PROKSCH, K. HARTMANN (2017): Faecal shedding of canine parvovirus after modified-live vaccination in healthy adult dogs. *Vet. J.* 219, 15-21.
- GLICKMAN, L. T., L. M. DOMANSKI, G. J. PATRONEK, F. VISINTAINER (1985): Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187, 589-594.
- GODSALL, S. A., S. R. CLEGG, J. H. STAVISKY, A. D. RADFORD, G. PINCHBECK (2010): Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals. *Vet. Rec.* 167, 196-201.
- GREEN C. E., N. DECARO (2011): Canine viral enteritis. U: Infection disease of the dog and cat, 4th Edition (Green C. E., ur.), Saunders Elsevier, Athens, Georgia, str. 67-75.
- GREENWOOD, N. M., W. S. CHALMERS, W. BAXENDALE, H. THOMPSON (1996): Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Vet. Rec.* 138, 495-496.
- HERNÁNDEZ-BLANCO, B., F. CATALA-LÓPEZ (2015): Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials. *Vet. Microbiol.* 180, 1-9.
- HONG, C., N. DECARO, C. DESARIO, P. TANNER, M. C. PARDO, S. SANCHEZ, C. BUONAVOGLIA, J. T. SALIKI (2007): Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 535-539.
- HORIUCHI, M., Y. YAMAGUCHI, T. GOJOBORI, M. MOCHIZUKI, H. NAGASAWA, Y. TOYODA, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA (1998): Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Virology.* 249, 440-452.
- HOUSTON, D. M., C. S. RIBBLE, L. L. HEAD (1996): Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 542-546.
- HUEFFER, K., C. R. PARRISH (2003): Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 392-398.

- IKEDA, Y., M. MOCHIZUKI, R. NAITO, K. NAKAMURA, T. MIYAZAWA, T. MIKAMI, E. TAKAHASHI (2000): Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology*. 278, 13-19.
- JONGENEEL, C. V., R. SAHLI, G. K. MCMASTER, B. HIRT (1986): A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* 59, 564-573.
- KANG, B. K., D. S. SONG, C. S. LEE, K. I. JUNG, S. J. PARK, E. M. KIM, B. K. PARK (2008): Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes*. 36, 127-133.
- KAPIL, S., E. COOPER, C. LAMM, B. MURRAY, G. REZABEK, L. JOHNSTON, G. CAMPBELL, B. JOHNSON (2007): Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol.* 45, 4044-4047.
- KUMAR, M., S. CHIDRI, S. NANDI (2010): Molecular cloning and restriction endonuclease analysis of canine parvovirus DNA amplified by polymerase chain reaction. *Glob. Vet.* 4, 125-129.
- KUMAR, S., STECHER G., K. TAMURA (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- LI, R., K. R. HUMM (2014): Canine parvovirus infection. U: Small animal critical care medicine, 2nd Edition (Silverstein D. C., H. Kate, ur.), Saunders Elsevier, Davis, California. str. 509-512.
- MACINTIRE, D. K., S. SMITH-CARR (1997): Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 19, 291-302.
- MACLACHLAN N. J., E. J. DUBOVI (2011): Parvoviridae. U: Fenner's veterinary virology, 4th Edition (MacLachlan, N. J., E. J. Dubovi, ur.), Saunders Elsevier, Oxford, UK, str. 225-235.
- MARKOVICH, J. E., K. M. STUCKER, A. H. CARR, C. E. HARBISON, J. M. SCARLETT, C. R. PARRISH (2012): Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 66-72.
- MATSUI, T., J. MATSUMOTO, T. KANNO, T. AWAKURA, H. TANIYAMA, H. FURUOKA, H. ISHIKAWA (1993): Intracellular inclusions in the stratified squamous epithelium of the tongue in dogs and cats with parvovirus infection. *Vet. Pathol.* 30, 303-305.
- MEERS, J., M. KYAW-TANNER, Z. BENSINK, R. ZWIJNENBERG (2007): Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 85, 392-396.
- MEUNIER, P. C., B. J. COOPER, M. J. APPEL, D. O. SLAUSON (1985): Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet. Pathol.* 22, 60-71.

- MIRANDA, C., C. R. PARRISH, G. THOMPSON (2016): Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Vet. Microbiol.* 183, 37-42.
- MOCHIZUKI, M., M. C. SAN GABRIEL, H. NAKATANI, M. YOSHIDA, R. HARASAWA (1993a): Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.* 55, 60-63.
- MOCHIZUKI, M., R. HARASAWA, H. NAKATANI (1993b): Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38, 1-10.
- MOCHIZUKI, M., M. HORIUCHI, H. HIRAGI, M. C. SAN GABRIEL, N. YASUDA, T. UNO (1996): Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2101-2105.
- MUZYCZKA, N., K. I. BERNS (2001): Parvoviridae: the viruses and their replication. U: *Fundamental virology*, vol. 4. (Knipe D. M., P. M. Howley, ur.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. str. 1089-1121.
- NAKAMURA, M., Y. TOHYA, T. MIYAZAWA, M. MOCHIZUKI, H. T. PHUNG, N. H. NGUYEN, L. M. HUYNH, L. T. NGUYEN, P. N. NGUYEN, P. V. NGUYEN, N. P. NGUYEN, H. AKASHI (2004): A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261-2269.
- NANDI, S., S. CHIDRI, M. KUMAR (2009): Molecular characterization and phylogenetic analysis of a canine parvovirus isolate in India. *Vet. Med. (Praha).* 54, 483-490.
- NANDI, S., K. KUMAR (2010): Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian J. Virol.* 21, 31-44.
- NEUERER, F.F., K. HORLACHER, U. TRUYEN, K. HARTMANN (2008): Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline Med. Surg.* 10, 247-251.
- NTAFIS, V., E. XYLOURI, I. KALLI, C. DESARIO, V. MARI, N. DECARO, C. BUONAVOGLIA (2010): Characterization of canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 737-740.
- OSHIMA, T., M. HISAKA, K. KAWAKAMI, M. KISHI, Y. TOHYA, M. MOCHIZUKI (2008): Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci* 70, 769-75.
- PARKER, J. S., C. R. PARRISH (1997): Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J. Virol.* 71, 9214-9222.

- PARRISH, C. R., P. H. O'CONNELL, J. F. EVERMANN, L. E. CARMICHAEL (1985): Natural variation of canine parvovirus. *Science*. 230, 1046-1048.
- PARRISH, C. R., C. F. AQUADRO, M. L. STRASSHEIM, J. F. EVERMANN, J. Y. SGRO, H. O. MOHAMMED (1991): Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 12, 6544- 6552.
- PARRISH, C. R. (1995): Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres. Clin. Haematol.* 8, 57-71.
- PEREIRA, C. A., T. A. MONEZI, D. U. MEHNERT, M. D'ANGELO, E. L. DURIGON (2000): Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127-133.
- PEREZ, R., L. FRANCIA, V. ROMERO, L. MAYA, I. LOPEZ, M. HERNANDEZ (2007): First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124, 147-152.
- PINTO, L. D., A. F. STRECK, K. R. GONÇALVES, C. K. SOUZA, À. O. CORBELLINI, L. G. CORBELLINI, C. W. CANAL (2012): Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165, 29-33.
- POLLOCK, R. V. (1982): Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103-119.
- POLLOCK, R. V., L. E. CARMICHAEL (1982): Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 37-42.
- ROBINSON, W. F., C. R. HUXTABLE, D. A. PASS (1980): Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet. Pathol.* 17, 282-293.
- SAGAZIO, P., M. TEMPESTA, D. BUONAVOGLIA, F. CIRONE, C. BUONAVOGLIA (1998): Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods.* 73, 197-200.
- SCHULTZ, R. (2006): Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Vet. Microbiol.* 117, 75-79.
- SHACKELTON, L. A., C. R. PARRISH, U. TRUYEN, E. C. HOLMES (2005): High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 379-384.
- SIEDEK, E. M., H. SCHMIDT, G. H. STURE, R. RAUE (2011): Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 124, 58-64.

- SPIBEY, N., N. M. GREENWOOD, D. SUTTON, W. S. CHALMERS, I. TARPEY (2008): Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128, 48-55.
- STEINEL, A., E. H. VENTER, M. VAN VUUREN, C. R. PARRISH, U. TRUYEN (1998): Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65, 239-242.
- TAMURA, K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678-687.
- TRUYEN, U., A. GRUENBERG, S. F. CHANG, B. OBERMAIER, P. VEIJALAINEN, C. R. PARRISH (1995): Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69, 4702-4710.
- TRUYEN, U., J. F. EVERMANN, E. VIELER, C. R. PARRISH (1996): Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology.* 215, 186-189.
- TRUYEN, U. (2006): Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13.
- TSAO, J., M. S. CHAPMAN, M. AGBANDJE, W. KELLER, K. SMITH, H. WU, M. LUO, T. J. SMITH, M. G. ROSSMANN, R. W. COMPANS, C. R. PARRISH (1991): The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science.* 251, 1456-1464.
- TURK, J., M. MILLER, T. BROWN, W. FALES, J. FISCHER, H. GOSSER, S. NELSON, D. SHAW, R. SOLORZANO (1990): Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 771-773.
- WALDVOGEL, A. S., S. HASSAM, R. WEILENMANN, J. D. TRATSCHIN, G. SIEGL, T. HANICHEN, J. BRINER, A. POSPISCHIL (1991): Retrospective study of myocardial canine parvovirus infection by in situ hybridization. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 38, 353-357.
- WANNER, T., J. NOAM, S. MAZAR (2003): Post vaccination evaluation of the immunization status of puppies for canine parvo and distemper virus using an in-clinic ELISA test. *Israeli J. Vet. Med.* 58, 104-107.
- YANG, S., S. WANG, H. FENG, L. ZENG, Z. XIA, R. ZHANG, X. ZOU, C. WANG, Q. LIU, X. XIA (2010): Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey. *Vet. Microbiol.* 143, 155-159.
- ZHOU, P., W. ZHENG, X. ZHANG, S. LI (2017): The genetic evolution of canine parvovirus - a new perspective. *PLoS One.* 12, e0175035.



## 8. SAŽETAK

U razdoblju od 1. lipnja 2015. do 31. ožujka 2017. godine iz veterinarskih organizacija s područja grada Zagreba ukupno je prikupljeno i obrađeno 747 uzoraka fecesa i obrisaka rektuma pasa koji su pokazivali znakove akutnog gastroenteritisa. Osim uzoraka fecesa za 228 pasa, prikupljeni su i podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkoj slici, tijeku i ishodu liječenja. Metodom lančane reakcije polimeraze u uzorcima fecesa ili obriscima rektuma dokazivana je prisutnost psećeg parvovirusa-2.

Na osnovu rezultata pretrage uzoraka ustanovljeno je da je parvovirusna infekcija pasa najznačajniji pojedinačni uzrok akutnog gastroenteritisa pasa na području grada Zagreba s prevalencijom od 47,37% u populaciji bolesnih pasa. Nakon određivanja nukleotidnog slijeda umnoženih odsječaka virusnog genoma ustanovljena je prisutnost sva tri poznata podtipa CPV-2 virusa, a najzastupljeniji su podtipovi CPV-2c (59%) i CPV-2a (23%). Dokazane su i aminokiselinske izmjene u kapsidi terenskih sojeva CPV-2 na mjestima 297 i 373 koje su ustaljene, a mogu utjecati na izbjegavanje imunskog odgovora domaćina.

Iz dodatnih podataka prikupljenih za statističku obradu bilo je vidljivo da način držanja uvjetuje razlike u zastupljenosti pojedinih podtipova virusa i riziku od oboljenja koji je značajno viši u populaciji napuštenih pasa. Najveća učestalost oboljenja od parvovirusne infekcije pasa je bila u prvoj godini života, s nešto smanjenim rizikom u dobi od četiri do šest mjeseci, ali je isto tako pokazano da imunoprofilaksa smanjuje rizik od infekcije CPV-2, neovisno o cijepnom i infektivnom podtipu virusa. Ovo istraživanje je također omogućilo kritičku prosudbu rezultata brzih imunokromatografskih testova za koje je ustanovljeno da imaju izrazito nisku osjetljivost u kliničkim uvjetima izvođenja.

Zaključno, određivanje podtipa infektivnog virusa nema klinički značaj, ali je izrazito bitno za praćenje epizootiologije bolesti. Isto tako, ovo istraživanje ukazalo je na ograničenja klasične metode lančane reakcije polimerazom te naglasilo potrebu za uvođenjem novih metoda dijagnostike koje bi omogućile razlikovanje cijepnog od terenskih sojeva.

## 9. SUMMARY

### PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CANINE PARVOVIRUS -2 VP2 GENE IN DOGS IN CROATIA

A total of 747 faecal samples or rectal swabs from dogs with clinical signs of acute gastroenteritis were collected between June 1<sup>st</sup> 2015 and March 31<sup>st</sup> 2017. Samples were obtained from veterinary organisations in the city of Zagreb area. Information about signalment, medical history, course and outcome of the treatment for 228 dogs were collected as well. All collected samples were tested for presence of canine parvovirus-2 (CPV-2) using polymerase chain reaction (PCR). The prevalence of 47.3% in the sick canine population makes CPV-2 the most significant single cause of acute gastroenteritis in dogs in the city of Zagreb area. Products of PCR reaction were sequenced and obtained nucleotide sequences confirmed the presence of all three CPV-2 subtypes. Subtype CPV-2c and CPV-2a were detected in 59% and 23% infected dogs, respectively. Additionally consistent amino acid substitutions have been demonstrated at site 297 and 373 in the viral capsid, which comprise immunogenic sites and may affect host immune response.

Statistical analysis revealed dog housing as important factor influencing CPV-2 subtype distribution and risk of acquiring CPV-2 infections. The highest incidence of parvovirus infection was detected during the first year of life, with a slightly lower risk between four to six months of age. This study showed that animals with history of vaccination were under lower risk of CPV-2 infection, regardless of the infectious viral subtype. In addition, results of statistical analysis showed extremely low sensitivity of rapid immunochromatographic tests results in the clinical setting.

To conclude, the determination of the infectious CPV-2 subtype has no clinical relevance, but gives extremely valuable data for surveillance of canine parvovirus enteritis. This study pointed out the limitations of classical polymerase chain reaction method and the need for introduction of new diagnostic that could distinguish field strains from vaccine strains.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8. svibnja 1989. godine u Zagrebu gdje sam završila "OŠ Medvedgrad". Obrazovanje sam nastavila u Gornjogradskoj Gimnaziji u Zagrebu, od 2004. do 2008. godine. Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2008. godine. Tijekom studija radila sam različite studentske poslove. Od 2014. do 2016. godine volontirala sam na klinici Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti sa klinikom, gdje sam zahvaljujući zaposlenicima klinike imala prilike učiti, raditi i razmišljati o različitim segmentima veterinarske medicine. U sklopu diplomskog rada 2015. godine pod stručnim vodstvom svojih mentora doc. dr. sc. Vladimira Stevanovića i doc. dr. sc. Suzane Hađine imala sam prilike stjecati nova znanja iz područja molekularne dijagnostike, u sklopu virusološkog laboratorija već navedene klinike. Veterinarsku praksu odrađivala sam u veterinarskoj ambulanti „Buba“, te sam kratko vrijeme volontirala u ambulanti za male životinje „At vet“.