

EPIZOOTIOLOŠKI ČIMBENICI INFEKCIJE RESPIRATORNIM KORONAVIRUSOM PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Ritoša, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:178:661881>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU
I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM

Ana Ritoša

**EPIZOOTIOLOŠKI ČIMBENICI INFEKCIJE RESPIRATORNIM
KORONAVIRUSOM PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2022.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM

Predstojnik: Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
3. Izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina (zamjena)

Prvo želim izraziti veliku zahvalnost mom mentoru izv. prof. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću na njegovom strpljenu, povjerenju i svojoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala mu i na svim korisnim savjetima i prenesenom znanju prilikom volontiranja na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Posebno se zahvaljujem najdražoj asistentici dr. med. vet. Ivi Benvin koja je bila dostupna 0-24 prilikom izrade ovog diplomskog rada, na svojoj pomoći oko istog i na lijepim uspomnama tijekom volontiranja.

Također zahvaljujem se djelatnicima Virološkog laboratorija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj pomoći oko istraživačkog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svim ostalim profesorima, docentima, asistentima i tehničkom osoblju sa Klinike za zarazne bolesti, koji su tijekom zadnje dvije godine nesebično prenosili svoje znanje i vještine, te učinili volontiranje jednim od lijepih uspomena mog studiranja.

Hvala svim mojim prijateljima, kolegama i Mariju na predivnim uspomena i što su studentski dani bili zabavni i bezbolni.

A zadnje i najveće hvala mojim roditeljima, sestri, nonićima i ujaku, koji su bili najveća moguća podrška u svakom obliku i omogućili mi da postanem dr. med. vet.

POPIS KRATICA:

- BCoV - (*engl. Bovine coronavirus*) - goveđi koronavirus
- CAV-2 - (*engl. Canine adenovirus type 2*) - pseći adenovirus 2
- CCoV – (*engl. - Canine coronavirus*) – pseći koronavirus
- CDV - (*engl. Canine distemper virus*) - virus štenećaka
- CHV - (*engl. Canine alphaherpesvirus type 1*) - pseći herpesvirus 1
- CIRDC - (*engl. Canine infectious respiratory disease complex*) - zarazni traheobronhitis/
zarazni kašalj/kašalj štenare
- CIV - (*engl. Canine influenza H3N8*) - influenza pasa H3N8
- CnPnV - (*engl. Canine pneumovirus*) - pneumovirus pasa
- CPIV - (*engl. Canine parainfluenza virus*) - virus parainfluence pasa
- CRCoV - (*engl. Canine respiratory coronavirus*) - respiratorni koronavirus pasa
- FIPV - (*engl. Feline infectious peritonitis virus*) - mačji zarazni peritonitis
- HCoV-229E - (*engl. Human coronavirus strain 229E*) - ljudski koronavirus - 229E
- HCoV-OC43 - (*engl. Human coronavirus strain OC43*) - ljudski koronavirus - OC43
- HE - (*engl. hemagglutinin–esterase*) - protein koji ima hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti
- IBV - (*engl. infectious bronchitis virus*) – virus zaraznog bronhitisa
- MERS - (*engl. Middle East Respiratory Syndrome*) - bliskoistočni respiratorni sindrom
- MHV - (*engl. Murine hepatitis virus*) - virus mišjeg hepatitisa
- mRNK – (*engl. messenger ribonucleic acid*) – glasnička ribonukleinska kiselina
- NsPs - (*engl. nonstructural proteins*) - nestrukturalni proteini
- ORFs - (*engl. open reading frames*) - otvoreni okviri za čitanje
- PCR - (*engl. polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimeraze
- PHEV - (*engl. Porcine hemagglutinating encephalomyelitisvirus*) - hemaglutinirajući virus encefalomijelitisa svinja
- qRT-PCR - (*engl. quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*) - PCR u stvarnom vremenu
- RdRp - (*engl. RNA-dependent RNA polymerase*) - RNK polimeraza ovisna o RNK
- RNK – ribonukleinska kiselina
- RT-PCR - (*engl. Reverse transcription polymerase chain reaction*) - metoda lančane reakcije polimeraze s obrnutim prepisivanjem

S protein - (*engl. Spike - S*) - šiljasti protein

SARS - (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome*) - teški akutni respiratorni sindrom

SPF – (*engl. specific pathogen free*) - slobodno od specifičnih patogenov

TCoV - (*engl. Turkey coronavirus*) - pureći koronavirus

TGEV - (*engl. porcine transmissible gastroenteritis virus*) - transmisivni gastroenteritis svinja

POPIS TABLICA, GRAFIKONA I SLIKA

TABLICE:

Tablica 1. Sastav kompleta QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250)

Tablica 2. Početnice za umnažanje odsječka genoma S proteina CRCoV korištene za izvođenje RT-PCR metode

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za izvođenje RT - PCR metode

Tablica 4. Broj pasa uključenih u istraživanje, podijeljeno na pozitivne i negativne na CRCoV, te vlasničke pse i pse iz skloništa

GRAFIKONI:

Grafikon 1. Zastupljenost vlasničkih pasa i pasa iz skloništa kod CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinka.

Grafikon 2. Zastupljenost pozitivnih i negativnih jedinka na CRCoV u odnosu na njihovu starost.

Grafikon 3. Zastupljenost kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava kod CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinka.

SLIKE:

Slika 1. Građa virusne čestice porodice *Coronaviridae*. Prilagođeno iz PAYNE, 2017.

Slika 2. Shema strukture šiljastog proteina (S protein) koronavirusa i njegove podjedinice S₁ i S₂. Prilagođeno iz LI F., 2016.

Slika 3. Filogenetsko stablo bazirano na djelomičnoj sekvenci gena za polimerazu koronavirusa. Prilagođeno iz ERLES i BROWNLIE, 2008.

Slika 4. Prikaz imunohistokemijskog bojanja CRCoV antigena u dušniku (A) i bronhiolima (B). CRCoV pozitivnih pasa. Prilagođeno iz MITCHELL i sur., 2013.

Slika 5. Dušnik psa koji zaražen CRCoV. Difuzno stvaranje nakupina trepetljika i multifokalni gubitak s raspršenim nekrotičnim epitelnim stanicama i blagom limfoplazmatičnom upalom. Prilagođeno iz PRIESTNALL i sur., 2013.

Slika 6. Dušnik psa; CRCoV pozitivan epitel i vrčaste stanice. Prilagođeno iz PRIESTNALL i sur., 2013.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. POVIJEST	3
2.2. ETIOLOGIJA	4
2.2.1. GRAĐA VIRUSNE ČESTICE	4
2.2.2. GRAĐA GENOMA	4
2.3 TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA	6
2.4. TENACITET	7
2.5. PROŠIRENOST	8
2.6. EPIZOOTIOLOGIJA	9
2.7. PATOGENEZA	9
2.8. KLINIČKA SLIKA	11
2.9. PATOANATOMSKI I HISTOLOŠKI NALAZ	11
2.10. DIJAGNOSTIKA	13
2.11. LIJEČENJE	13
2.12. IMUNOPROFILAKSA	14
2.13. JAVNO ZDRAVSTVO	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1 UZORKOVANJE	16
3.2 MOLEKULARNA METODA DOKAZA UZROČNIK	16
3.2.1. PRIPREMA UZORAKA	16
3.2.2 IZDVAJANJE VIRUSNE RNK	16
3.2.3. POSTUPAK IZVOĐENJA PRETRAGE LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE	17
3.2.4 ELEKTROFOREZA U GELU	19
3.2.5. NANOŠENJE UZORAKA U GEL I POSTUPAK ELEKTROFOREZE	20
3.3. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA PROIZVODA RT- PCR	21
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	21
4. REZULTATI	22
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČCI	28
7. LITERATURA	29
8. SAŽETAK	35
9. SUMMARY	36
10. ŽIVOTOPIS	37

1. UVOD

Zarazni traheobronhitis, zarazni kašalj ili kašalj štenare (*engl. Canine infectious respiratory disease complex - CIRDC*), je akutna, vrlo kontagiozna bolest kod pasa, koja zahvaća ždrijelo, dušnik i bronhe te katkad sluznicu nosa i donji dišni trakt (APPEL i BINN, 1987.).

Bolest je najčešće opisana u pasa smještenih u skupinama kao što su skloništa, uzgajvačnice ili centri za obuku pasa, ali se često dijagnosticira i kod pasa držanih kao kućni ljubimci koji dolaze u kontakt s drugim psima na mjestima poput izložbe pasa, veterinarske ambulante i slično (BUONAVOGLIA i MARTELLA, 2007.; MOCHIZUKI i sur., 2008.; SINGLETON i sur., 2019.). Zarazni traheobronhitis proširen je po cijelom svijetu te je jedna od najučestalijih zaraznih bolesti pasa (BUONAVOGLIA i MARTELLA, 2007.).

Etiologija CIRDC je multikazualna odnosno sastoji se od više bakterijskih i virusnih uzročnika. Primarnim virusnim uzročnicima smatraju se virus parainfluence pasa (*engl. Canine parainfluenza virus - CPIV*) (APPEL i PERCY, 1970.), pseći adenovirus 2 (*engl. Canine adenovirus type 2 - CAV-2*) (DITCHFIELD i sur., 1962.), virus štenećaka (*engl. Canine distemper virus - CDV*) (DAY i sur., 2020.) i pseći herpesvirus 1 (*engl. Canine alphaherpesvirus type 1 - CaHV-1*) (KARPAS i sur., 1968.; RONSSE i sur., 2002.). U protekla dva desetljeća u etiologiju CIRDC dodani su još respiratorni koronavirus pasa (*engl. Canine respiratory coronavirus - CRCoV*) (ERLES i sur., 2003.), pneumovirus pasa (*engl. Canine pneumovirus - CnPnV*) (RENSHAW i sur., 2010.), i influenza pasa H3N8 (*engl. Canine influenza H3N8 - CIV*) (CRAWFORD i sur., 2005.). Od bakterijskih uzročnika najznačajnija je *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (BEMIS i sur., 1977.). Osim patogena, u etiologiji imaju ulogu okolišni čimbenici te imunološki sustav jedinke (ERLES i sur., 2003.).

Virus CRCoV je prvi puta izoliran 2003. godine kod pasa oboljelih od CIRDC, smještenih u skloništu u Ujedinjenom Kraljevstvu, te je najčešće primijećen kod pasa s blagim kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava (ERLES i sur., 2003.). Brzo širenje CRCoV kod pasa u skloništima, upućuje na to da je virus izrazito kontagiozan. Dominantno mjesto nalaska CRCoV je dišni sustav, stoga može se pretpostaviti da se virus širi dišnim sekretima koje primljiva jedinka najvjerojatnije udiše, te ili dolazi u izravan kontakt ili neizravno kontaktom s kontaminiranim površinama (ERLES i BROWNLIE, 2005.).

Ovaj virus je opisan diljem svijeta (KANESHIMA i sur., 2006.; PRIESTNALL i sur., 2006.; YACHI i MOCHIZUKI, 2006.; DECARO i sur., 2007.; PRIESTNALL i sur., 2007.; ERLES i

BROWNLIE, 2008.; SPISS, 2012.; SCHULZ i sur., 2014.; KNESL i sur., 2009.; MORE i sur., 2020.) i jedan je od značajnijih patogena CIRDC.

Cilj ovog istraživanja bio je prikupiti uzorke, te na osnovi dobivenih rezultata i podataka utvrditi molekularnom metodom prevalenciju CRCoV u Republici Hrvatskoj i njegov značaj kod pasa s kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. POVIJEST

Respiratorni koronavirus pasa (CRCoV), prvi je put opisan 2003. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu u pasa smještenih u skloništu (ERLES i sur., 2003.). Ta je ustanova imala velik promet pasa te je prijavljivala znatan broj dišnih infekcija, koje su se pojavljivale enzootski iako je cijepjenje pasa, preporučeno protiv uzočnika CIRDC, bilo uredno. Istraživanjem uzročnika CIRDC ustanovljen je koronavirus u ždrijelu i uzorcima plućima pomoću metode lančane reakcije polimerazom s obrnutim prepisivanjem (*engl. Reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR*). Izoliran CRCoV bio je različit od do tada već poznatog koronavirusa pasa (*engl. - Canine coronavirus - CCoV*) koji je uzročnik gastroenteritisa. Virus CRCoV je najčešće bio dokazan u ždrijelu pasa s blagim kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava odnosno blagim kašljem, a rijetko kod pasa bez kliničkih znakova ili s umjerenim do teškim kliničkim znakovima kao što su teški kašalj, nosni iscjedak, nevoljkost ili tešku bolest dišnog sustava s dokazanom bronhopneumonijom. Nakon tri tjedana u skloništu, skoro 100% pasa bilo je pozitivno na CRCoV protutijela, za razliku od prvog dana kad je udio pozitivnih pasa iznosio 30%. Zaključeno je da prisutnost protutijela za CRCoV prvog dana, smanjuje rizik razvijanja CIRDC što upućuje na to da CRCoV ima ulogu u patogenezi CIRDC (ERLES i sur., 2003.).

U istraživanju 2005. godine, CRCoV je otkrivena kod pasa u dva centra za obuku radnih pasa (ERLES i BROWNILE, 2005.). Serumi su skupljani prilikom izbivanja dišnih bolesti i četiri tjedna nakon, te je kod gotovo svih pasa smještenih u centru ustanovljena serokonverzija na CRCoV. Također lančanom reakcijom polimeraze (*engl. Polymerase chain reaction - PCR*) obrisaka ždrijela kod dva pasa s kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava dokazan je CRCoV. Nisu svi psi s razvijenim protutijelima pokazivali znakove CIRDC, ali unatoč tome to je bilo drugo istraživanje koje je povezivalo CRCoV s dišnim bolestima kod pasa.

Retrospektivno istraživanje rađeno pomoću imunohistokemije na arhivskim uzorcima od 1971. do 2003. godine, životinja s dišnim bolestima, ukazuje na to da je CRCoV već 1996. godine bio prisutan u Sjevernoj Americi. Kriterij odabiranja uzoraka bila je konačna histomorfološka dijagnoza upale dušnika, bronha ili bronhiola. Antigeni CRCoV pronađeni su u cilindričnom epitelu bronha ili bronhiola te istraživanje podupire CRCoV kao uzročnika u diferencijalnoj dijagnostici dišnih bolesti pasa odnosno CIRDC (ELLIS i sur., 2005.).

Rađeno istraživanje na štencima koji su bili izloženi BCoV dokazalo je da štenci mogu razviti neutralizirajuća protutijela na goveđi koronavirus (*engl. Bovine coronavirus – BCoV*) što ide u prilog tezi da je CRCoV zapravo prešao s goveda na pse (KANESHIMA i sur., 2007.).

2.2. ETIOLOGIJA

2.2.1. GRADA VIRUSNE ČESTICE

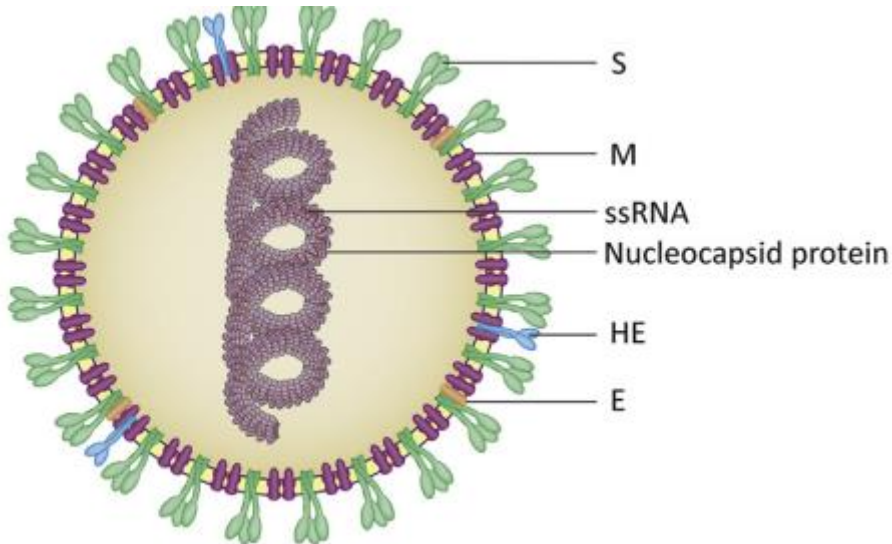
Virusi porodice *Coronaviridae* su pleomorfne čestice s ovojnicom, veličine od 80 do 220 nm. Porodica se dijeli na rod koronavirusi koji su uglavnom sferičnog oblika, i rod torovirusa oblika bubrega ili diska (MACLACHLAN i DUBOVI, 2010.). Koronavirusne čestice su ovijene virusne čestice s istaknutim šiljcima pa pod elektronskim mikroskopom podsjećaju na krunu (*lat. Corona*) zbog čega su i dobili ime koronavirusi (PAYNE, 2017., SU i sur., 2016.).

Unutar ovojnice nalazi se nukleokapsida koja se sastoji od ribonukleinske kiseline (RNK) povezane s nukleoproteinom (N). Proteini povezani s ovojnicom su membranski protein (M) i protein ovojnice (E), a neki koronavirusi koji spadaju u podskupinu betakoronavirusa, sadrže dodatni membranski protein koji ima hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti (*engl. hemagglutinin–esterase - HE*) (PAYNE, 2017.). Šiljasti protein (*engl. Spike - S*) je glikoprotein koji se proteže od površine virusne čestice te sudjeluje u vezanju virusa za receptore stanica domaćina (NAQVI i sur., 2020.; PAYNE, 2017.) i meta je neutralizirajućih protutijela imunološkog sustava domaćina (HOFMANN i sur., 2004.). S protein se može podijeliti u dvije funkcionalno različite podjedinice, odnosno S₁ i S₂. Podjedinica S₁ je uključena u prepoznavanje receptora, dok podjedinica S₂ olakšava membransku fuziju i usidruje S protein u virusnu ovojnicu (KIRCHDOERFER i sur., 2016.; WALLS i sur., 2016.).

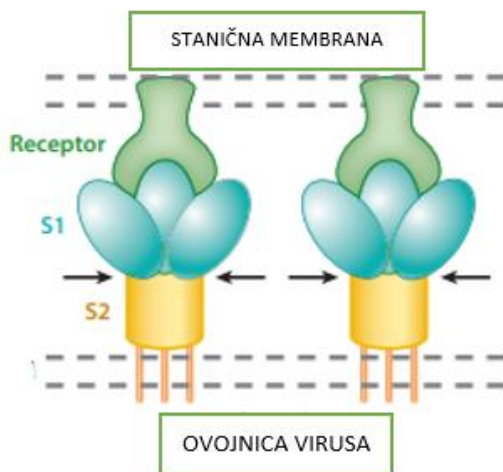
2.2.2. GRADA GENOMA

Genomi porodice *Coronaviridae* su jednolančane pozitivno nabijene RNK koje su zarazna (MACLACHLAN i DUBOVI, 2010.). Veličina RNK je od 25000 do 32000 nukleotida te sadrži sedam do deset otvorena okvira za čitanje (*engl. open reading frames - ORFs*). Gotovo dvije trećine genoma sastoji se od nestrukturalnih proteina (*engl. nonstructural proteins - nsps*) koji su potrebni za transkripciju i umnažanje genoma. Među njima se nalazi nsp12, odnosno RNK polimeraza ovisna o RNK (*engl. RNA-dependet RNA polymerase - RdRp*) (PAYNE, 2017.).

S protein je veliki transmembranski protein te se sastoji od 1160 aminokiselina, primjerice kod virusa zaraznog bronhitisa (*engl. Infectious bronchitis virus – IBV*) ptica, pa do 1400 aminokiselina kod virusa zaraznog peritonitisa mačaka (*engl. Feline infectious peritonitis – FIPV*). Ovaj je protein visoko glikoliziran jer sadrži 21 do 35 mjesta N-glikozilacije (BELOUZARD i sur.,2012.).



Slika 1. Građa virusne čestice porodice *Coronaviridae*. Prilagođeno iz PAYNE, 2017.



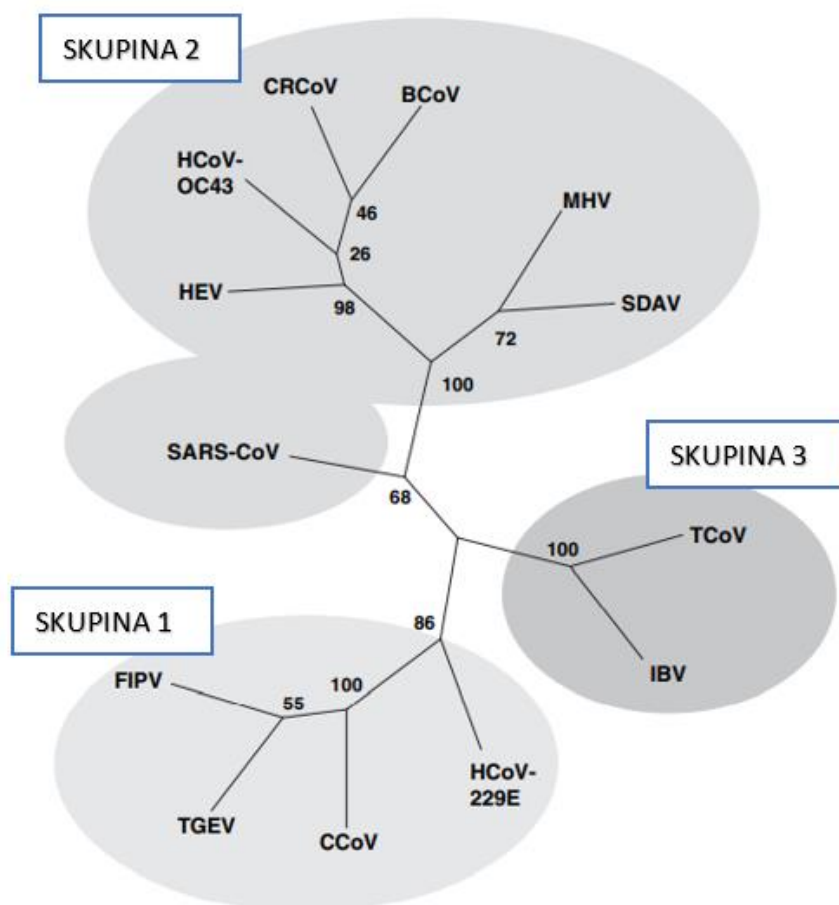
Slika 2. Shema strukture šiljastog proteina (S protein) koronavirusa i njegove podjedinice S₁ i S₂. Prilagođeno oz LI F., 2016.

2.3 TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA

Coronaviridae je porodica koja skupa s porodicama *Arteriviridae* i *Roniviridae* spada u red *Nidovirales*. Porodica *Coronaviridae* obuhvaća dva roda, odnosno rod *Coronavirus* i rod *Torovirus*. Rod *Coronavirus* može se dalje podijeliti u najmanje tri grupe s obzirom na njihova genetska i serološka svojstva (MACLACHLAN i DUBOVI, 2010.).

U prošlosti su se koronavirusi dijelili na skupinu jedan, skupinu dva i skupinu tri. Većina virusa u skupini dva sadržali su već spomenuti HE, uključujući CRCoV zbog čega je tu i bio smješten. U skupini dva nalazili su se i goveđi koronavirus (BCoV) koji je genetski najrodniji sa CRCoV (ERLES i BROWNLIE, 2008.). Osim BCoV, skupini dva pripadali su, ljudski koronavirus - OC43 (*engl. Human coronavirus strain OC43 - HCoV-OC43*) i hemaglutinirajući virus encefalomijelitisa svinja (*engl. Porcine hemagglutinating encephalomyelitisvirus - PHEV*) te dodatno virus mišjeg hepatitisa (*engl. Murine hepatitis virus - MHV*). Korona pasa povezana s gastroenteritisom (*engl. Canine coronavirus - CCoV*) skupa s drugim virusima poput virusa mačjeg zaraznog peritonitisa (FIPV), transmisivnog gastroenteritisa svinja (*engl. porcine transmissible gastroenteritis virus - TGEV*) i ljudskog koronavirus - 229E (*engl. Human coronavirus strain 229E - HCoV-229E*) nalazili su se u skupini jedan, dok se u skupini tri pripadali ptičji koronavirus (*engl. Avian coronaviruses viruses infectious bronchitis virus - IBV*) i pureći koronavirus (*engl. Turkey coronavirus - TCoV*). (WEIS i NAVAS-MARTIN, 2005.; ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Prema sadašnjoj podijeli porodica *Coronaviridae* dijeli se u potporodice *Coronavirinae* i *Torovirinae* te je potporodica *Coronavirinae* još podijeljena na rodove *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* i *Gammacoronavirus* (PAYNE, 2017.). Betakoronavirusi su ekvivalentni skupini dva, stoga CRCoV spada u rod *Betacoronavirus* skupa sa već spomenutim virusima. U betakoronaviruse također spadaju svi poznati koronavirusi koji uzrokuju pneumoniju kod čovjeka poput teškog akutnog respiratornog sindroma (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS*), bliskoistočnog respiratornog sindroma (*engl. Middle East Respiratory Syndrome - MERS*) i SARS-CoV-2 (REHMAN i sur., 2020.).



Slika 3. Filogenetsko stablo bazirano na djelomičnoj sekvenci gena za polimerazu koronavirusa. Prilagođeno iz ERLES i BROWNLIE, 2008.

2.4. TENACITET

Istraženo je da ljudski koronavirusi mogu ostati zarazni na neživim površinama do devet dana pri sobnoj temperaturi (KAMPF i sur., 2020.). Rastom temperature trajanje njihove postojanosti se smanjuje. Životinjski koronavirusi poput TGEV ili CCoV mogu izdržati duže, odnosno do dvadeset osam dana. Dezinfekcija 0,1% hipokloritom ili 62% do 71% etanolom, značajno smanjuje infektivnost koronavirusa na površinama.

U vodi je SARS-CoV-1 ostao postojan tijekom tri dana (DUAN i sur., 2003.), dok je HCoV-229E preživljavao šest dana u vodi iz slavine (GUNDY i sur, 2009.). Životinjski koronavirusi poput TGEV i MCoV, pokazali su mnogo veću izdržljivost u destiliranoj vodi od šest do sedam tjedana (CASANOVA i sur., 2009.).

Duže preživljavanje koronavirusa pri niskim temperaturama i niskoj relativnoj vlazi objašnjava opažene vrhunce slučajeva SARS-CoV-2 tijekom hladne i suhe klime u regijama umjerenog pojasa. Također s obzirom da HCoV-229E, SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 mogu ostati infektivni u zraku 3 do 16 sati, a preživjeti par dana, može se zaključiti da je zračni prijenos moguć (ABOUBAKR i sur., 2020.).

2.5. PROŠIRENOST

Nakon otkrića CRCoV 2003. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu (ERLES i sur., 2003.), CRCoV je pronađena diljem svijeta (KANESHIMA i sur., 2006.; PRIESTNALL i sur., 2006.; YACHI i MOCHIZUKI, 2006.; DECARO i sur., 2007.; PRIESTNALL i sur., 2007.; ERLES i BROWNLIE, 2008.; KNESL i sur., 2009.; SPISS, 2012.; SCHULZ i sur., 2014.; MORE i sur., 2020.).

Utvrđivanjem seroprevalencije, u Italiji su dobiveni rezultati od 20,0% (PRIESTNALL i sur., 2007.) i 32,1 % (DECARO i sur., 2007.), dok je u Ujedinjenom Kraljevstvu kroz više istraživanja ustanovljena seroprevalencija od 22,2% do 54,2% (ERLES i sur., 2003.; ERLES i BROWNLIE, 2005.; PRIESTNALL i sur., 2006.). U istraživanju 2017. godine gdje su uzorci bili skupljeni iz cijele Europe, seroprevalencija je iznosila 47,0%, te je ustanovljeno da je seroprevalencija viša u skloništima za pse nego kod pasa držanih za kućne ljubimce (MITCHELL i sur., 2017.). Podatak o seroprevalenciji CRCoV na Novom Zelandu iznosi 53% (MORE i sur., 2020.) dok je u Japanu iznosio 17,8% (KANESHIMA i sur., 2006.).

Prevalencija CRCoV utvrđena molekularnom metodom na obriscima nosa i ždrijela niža je nego seroprevalencija. Kod istraživanja na skupinama pasa s kliničkim znakovima CIRDC, prevalencija CRCoV u Italiji iznosila je 8,97% (DECARO i sur., 2016.), 8,8% u Austriji (SPISS, 2012.), 9,8% u Njemačkoj (SCHULZ i sur., 2014.) i 4,7% u Ujedinjenom Kraljevstvu kod pasa iz skloništa (ERLES i BROWNLIE, 2005.). Kod skupine zdravih pasa u Njemačkoj nije bilo pozitivnih jedinki (SCHULZ i sur., 2014.). Na drugom istraživanju u Austriji gdje je grupa obuhvaćala većinu pasa s kliničkim znakovima CIRDC, ali i zdrave pse, prevalencija je iznosila 7,5 % (HIEBL i sur., 2019.).

S obzirom na navedene podatke i retrospektivno istraživanje koje je pokazalo da je CRCoV bila prisutna već 1996. u Sjevernoj Americi (ELLIS i sur., 2005.), teško je odrediti podrijetlo i puteve širenja CRCoV.

2.6. EPIZOOTIOLOGIJA

Koronavirusi su patogeni koji uzrokuju dišne bolesti u mnogo vrsta životinja i ljudi (ERLES i BROWNLIE, 2008.). Tako je i CRCoV prvi puta opisana 2003. godine kod pasa povezanih sa zaraznim traheobronhitisom (CIRD) (ERLES i sur., 2003.), te se smatra da ima bitnu ulogu u ranoj fazi CIRDC predisponiranjem psa težim kliničkim oblicima zbog sekundarnih bakterijskih infekcija (MITCHELL i sur., 2013.). S obzirom da je dominantno mjesto nalaska CRCoV u uzorcima uzetim iz dišnog sustava, pretpostavlja se da se CRCoV širi dišnim sekretima, dok je put ulaska u dišni sustav najvjerojatnije kapljičnom inhalacijom ili direktnim kontaktom s izlučevinama ili kontaminiranom okolinom (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Epizootiologija nije potpuno razjašnjena ali pretpostavlja se da uvjeti gdje se puno pasa nalazi na istom mjestu doprinose širenju CRCoV, kao i ostalih CIRDC patogena. Virus je pronađen kod pasa različitih pasmina, spola i dobi, te nema pokazatelja dobne, spolne ili pasminske predispozicije (WILLE i sur., 2020.).

Odrasli psi će češće biti seropozitivni na CRCoV nego psi koji su mlađi od godine dana (PRIESTNALL i sur., 2006.; PRIESTNALL i sur., 2007.). To se može povezati s povećavanjem kontakta jedinke s drugim psima i većim izlaganjem CRCoV starenjem.

Primjećeno je da u skloništima za pse, serokonverziji na CRCoV često prethodi izbijanje CIRDC, te nakon dolaska u sklonište seronegativni psi kroz tri tjedna postanu seropozitivni, zbog čega nekad seroprevalencija u skloništima može iznositi 100% (ERLES i sur., 2003.; ERLES i BROWNLIE, 2005.).

2.7. PATOGENEZA

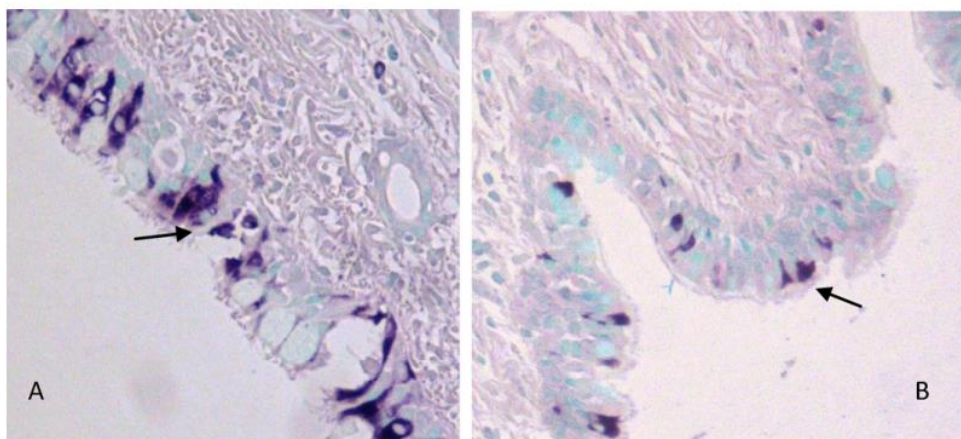
U istraživanju objavljenom 2013. godine korišteni su psi slobodni od specifičnih patogena (*engl. specific pathogen free - SPF*) koji su prije početka istraživanja bili negativni na CRCoV te CRCoV seronegativni (MITCHELL i sur., 2013.). Psi su bili podijeljeni u šest grupa, od čega je jedna grupa služila kao negativna kontrola dok je ostalih pet bilo izloženo različitim sojevima CRCoV nulti i prvi dan. Tijekom istraživanja psi su praćeni u slučaju kliničkih znakova bolesti, a 3., 6. i 14. dan psi su bili eutanazirani. Do završetka istraživanja, svi su psi iz grupe koja je služila kao negativna kontrola ostali zdravi, dok su psi iz ostalih pet grupa izloženih virusu razvili blage kliničke znakove oboljenja poput nosnog iscjetka, kašljanja i kihanja. Kod pasa je obilnije izlučivanje virusa, detektirano pomoću PCR-a ili uzgoja virusa iz obrisaka ždrijela,

viđeno drugi dan od infekcije, te je uglavnom trajalo do šestog dana. Što se tiče tkivnog tropizma, CRCoV je najčešće pronađena u dušniku, nosnim tonzilama i ispirku plućima. Imunohistokemijski CRCoV antigen je dokazan u citoplazmi trepetljikastog epitela i vrčastim stanicama dušnika i bronhiola inficiranih pasa. Histopatološkom pretragom uočena je povezanost između CRCoV i upale epitela nosa i dušnika s gubitkom ili oštećenjem trepetljika. Trepetljike su ključne u rješavanju patogena u dišnom sustavu, te njihovim gubitkom omogućena je infekcija sekundarnim patogenima što utječe na težinu i trajanje bolesti.

Koronavirusi koriste različite mehanizme izbjegavanja antivirusnog odgovora domaćina, što omogućava umnažanje virusa i širenje unutar domaćina. Dokazano je da ostali betakoronavirusi mogu potisnuti aktivaciju gena inhibicijom transkripcijskog faktora IRF-3. Na taj način smanjuju proizvodnju proupalnih citokina (VERSTEEG i sur. 2007.; FRIEMAN i BARIC 2008.).

Nalazi in vitro studije navode da i CRCoV isto može inhibirati proupalne citokine i indukciju kemokina u ranim fazama infekcije (PRIESTNALL i sur., 2009.). U toj je studiji na sustavu kulture organa psećeg dušnika, glasnička RNK (engl. messenger ribonucleic acid – mRNA) snizila tri proupalna citokina, odnosno interleukin – 6, interleukin-8 i faktor nekroze tumora 24 do 48 sati nakon inokulacije, dok je virusno optrećenje tijekom tog vremena ostalo stabilno.

Značajne promjene zabilježene su i u leukogramu gdje je najznačajnija limfocitoza, neutopenija, skretanje u lijevo i neutrofilna toksičnost. Navedene promjene ukazuju na akutnu upalnu reakciju s visokom potrebom za neutrofilima i njihovom ubrzanom proizvodnjom u koštanoj srži (MITCHELL i sur., 2013.).



Slika 4. Prikaz imunohistokemijskog bojanja CRCoV antigena u dušniku (A) i bronhiolima (B) CRCoV pozitivnih pasa. Prilagođeno iz MITCHELL i sur., 2013.

2.8. KLINIČKA SLIKA

Nemoguće je pisati o kliničkoj slici koju uzrokuje CRCoV bez spominjanja kliničke slike CIRDC, jer u slučajevima gdje je CRCoV prisutna, obično su prisutni i drugi CIRDC patogeni (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

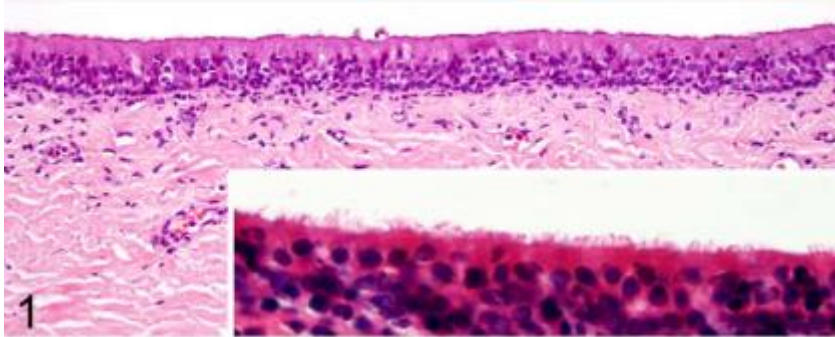
Prvotna klinička slika koja se povezuje s CIRDC je akutno nastupanje paroksizmalnog kašlja koji se često povezuje s aktivnošću same jedinke. U slučaju upale grkljana, natečene glasnice mogu povećati otpor strujanju zraka rezultirajući promuklim glasanjem. Kod pojave upala dušnika, moguće je palpacijom dušnika izazvati kašalj ali se taj klinički nalaz ne smije uzeti kao dijagnoza jer nije konstantan nalaz. Prisutnost veće količine sluzi proizvedene u dušniku i donjim dišnim putevima može rezultirati produktivnim kašljem. Nije neuobičajeno da psi progutaju iskašljani sadržaj, ali psi koji mogu, obično iskašljaju bistru do bijelu sluz što vlasnik pogrešno može opisat kao povraćanje. Od kliničkih znakova mogu se još pojaviti kihanje te iscjedak iz očiju i nosa koji je serozan, mukozan ili mukopurulentan. Vrućica, nevoljkost i nedostatak apetita rjeđe se javljaju te uglavnom upućuju na pojavu bakterijske infekcije u donjim dišnim putevima. Klinički znakovi su teži kod štenadi i pasa koji nisu cijepljeni protiv određenih uzročnika CIRDC. Vrijeme između izlaganja i nastupa kliničkih znakova je između tri do deset dana, dok trajanje same bolesti varira od jedinke do jedinke gdje ovisi o gustoći naseljenosti pasa, prvotnom zdravstvenom stanju jedinke, koliko je respiratornih patogena uključeno i tako dalje. U većini slučajeva klinički znakovi su blagi te mogu spontano nestati kroz nekoliko dana. U slučajevima gdje je bolest uznapredovala do teške infekcije donjih dišnih prohoda može uslijediti smrt (GREENE 2012.).

Eksperimentalnim istraživanjem gdje su SPF psi bili inficirani CRCoV, najčešći klinički znakovi oboljenja bili su nosni iscjedak, kihanje i kašljanje (MITCHELL i sur., 2013.).

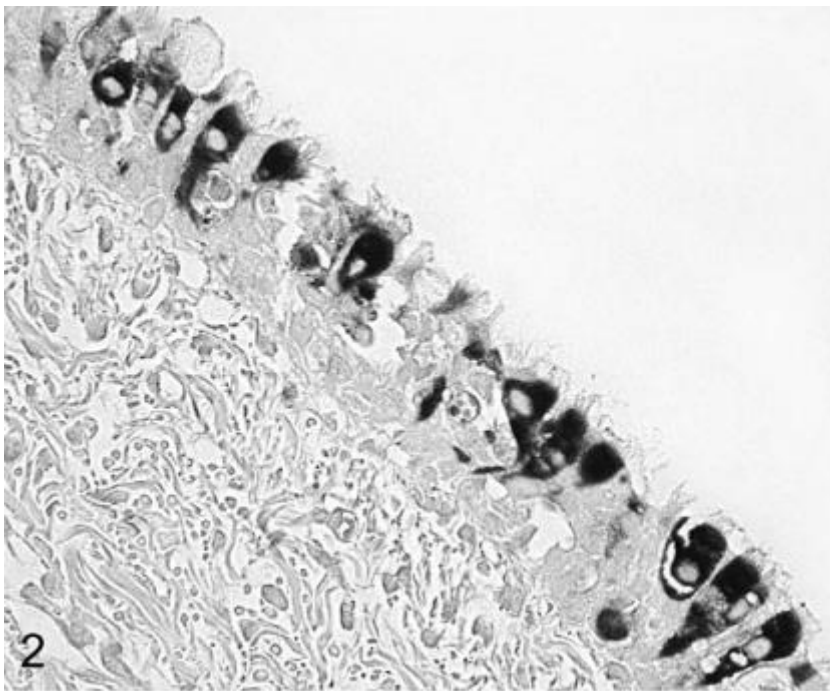
2.9. PATOANATOMSKI I HISTOLOŠKI NALAZ

S obzirom na da je u patogenezu CIRDC uključeno više patogena, teško je bilo koju histopatološku leziju povezati samo s jednim od tih patogena. U pokusnim infekcijama SPF pasa CRCoV, histopatološke promjene odgovarale su promjenama primijećenim u ranim fazama CIRDC. U oba slučaja dominirala je blaga do umjerena upala sluznice dušnika i nosa s gubitkom cilija. Također perivaskularne i peribronhalne limfoidne nakupine uočene su u

plućima, ali promjene su bile manje značajne od onih u gornjim dišnim putevima (MITCHELL i sur., 2013.).



Slika 5. Dušnik psa koji zaražen CRCoV. Difuzno stvaranje nakupina trepetljika i multifokalni gubitak s raspršenim nekrotičnim epitelnim stanicama i blagom limfoplazmacitnom upalom. Prilagođeno iz PRIESTNALL i sur., 2013.



Slika 6. Dušnik psa; CRCoV pozitivan epitel i vrčaste stanice. Prilagođeno iz PRIESTNALL i sur., 2013.

2.10. DIJAGNOSTIKA

Kod dijagnoze samog CIRDC bitni su podaci o izloženosti psa drugim psima, o kliničkim znakovima i odgovoru na liječenje. Kompletna krvna slika i biokemijski profil nisu dijagnostički, ali kod nekompliciranog oblika CIRDC moguće je pronaći stres-leukogram s neutrofilijom, limfopenijom i eozinopenijom, dok je kod kompliciranog oblika CIRDC uobičajen upalni leukogram sa značajnom leukocitozom ili skretanjem u lijevo te pratećom vrućicom. Također kod kompliciranog oblika može biti koristan rendgenogram gdje obično vidljiva hiperinflacija i segmentna atelektaza pluća (GREENE, 2012.).

Zbog uključenosti više patogena u etiologiju CIRDC, CRCoV kao jedan od njih, nije moguće dijagnosticirati samo na osnovu kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Pretraživanje obrisaka iz nosa, ždrijela i konjunktiva pomoću PCR-a na virusne i baterijske uzročnike je moguće ali je rezultate teško interpretirati s obzirom da je uzročnike moguće izolirati iz zdravih i inficiranih pasa (LAPPIN i sur., 2017.).

Najprikladniji dijagnostički test za dokaz CRCoV je RT-PCR koji umnaža dio gena za S protein ili protein hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti (ERLES i sur., 2003.; YACHI i MOCHIZUKI, 2006.). Metoda ima visoku osjetljivost i zato je korisna kod uzoraka s potencijalno malo stanica kao što su obrisci nosa i ždrijela. Obje metode su specifične za CRCoV te ne detektiraju CCoV. S obzirom da je CRCoV najčešće nađen u nosnoj šupljini, nosni obrisци su prikladni kao dijagnostički materijal. Osim nosnih obrisaka, prikladni su i obrisци ždrijela te u slučaju da su dostupni obdukcijски uzorci, mogu se uzeti u obzir uzorci sluznice nosne šupljine, nosne tonzile, dušnika i pluća (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Serologija je također korisna u dijagnostici CRCoV ako se serumi prikupljaju prilikom izbivanja bolesti i dva do tri tjedna nakon (ERLES i sur. 2003.; DECARO i sur., 2007.).

2.11. LIJEČENJE

Nema specifičnog liječenja infekcija uzrokovanih CRCoV, ali kod liječenja CIRDC bitno je usredotočiti se na sprječavanje i liječenje bakterijskih infekcija (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Liječenja pasa s nekompliciranim oblikom CIRDC, odnosno u slučaju da znakovi bolesti traju kraće od jednog tjedna, te je jedinka bistra i dobrog apetita, zasniva se na potpornoj terapiji

(LAPPIN i sur. 2017.). Moguće je korištenje antitusika za pružanje olakšanja jedinki ali treba biti oprezan u slučaju produktivnog kašlja gdje je njihovo korištenje kontraindicirano (THRUSFIELD i sur. 1991.).

Terapija antibioticima preporučena je u pasa kojima klinički znakovi traju duže od jednog tjedna ili pokazuju znakove bakterijske pneumonije poput pireksije, nemoći, smanjenog apetita i alveolarni plućni crtež na rendgenogramu. Antibiotici bi trebali biti izabrani prema testu antimikrobne osjetljivosti s obzirom da je antimikrobna rezistencija sve učestalija, osobito među izolatima bakterije *B. bronchiseptica*. Doksiciklin je antibiotik izbora kod sumnje na infekciju *B. bronchiseptica* ili *Mycoplasma cynos*, dok kod sumnje na sekundarnu bakterijsku infekciju u čijoj podlozi leži virusna infekcija, antibiotici širokog spektra su bolji izbor (LAPPIN i sur. 2017.).

Dodatna potporna terapija uključuje hidrataciju, nutritivnu potporu, terapiju kisikom, nebulizaciju i kupaju. Također je preporučljivo smanjiti nadraživanje dušnika primjerice izbjegavanjem ogrlice za pse (REAGEN i SYKES 2020.).

2.12. IMUNOPROFILAKSA

Cjepiva protiv uzročnika CIRDC dostupna su protiv *B. bronchiseptica*, CAV-2, CDV, CPIV te kod gravidnih kuja protiv CHV. Imunitet protiv CDV sprječava zarazu i stoga 100 % štiti protiv uključenosti CDV u CIRDC (WILSON i sur., 2014.), dok imunitet dobiven cijepljenjem protiv CAV-2 i CPIV smanjuje oboljenje i izlučivanje virusa ali ne štiti stopostotno Fod zaraze (EMERY i sur., 1976.; KONTOR i sur., 1981.; WILSON i sur., 2014.). Bez obzira na mogućnost pojave kliničkih znakova i izlučivanje virusa, cjepiva smanjuju težinu kliničke slike i potrebu za antibioticima. Cijepljeni psi izlučuju atenuirane virusne čestice te ih šire na druge pse s kojima su u kontaktu, što potiče razvijanje imunosti kod necijepljenih pasa, ali bez razvijanja bolesti (RUCHGULLIE i sur., 2016.).

Iako cjepiva protiv određenih patogena CIRDC postoje te je cijepljenje učestalo, ta kompleksna bolest i dalje ostaje problem, pogotovo u velikim populacijama, zbog prisutnosti ostalih patogena (ERLES i BROWNLIE, 2008.; WILLE i sur., 2020.) što ukazuje na njihovu ulogu u samoj patogenezi bolesti (BUONAVOGLIA i MARTELLA, 2007.). Zato i povijest cijepljenja kod psa s kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava ne igra ulogu u isključivanju CIRDC (GREENE, 2012.).

Cjepivo za CRCoV nije još dostupno, dok cjepivo protiv CCoV ne može pružati zaštitu zbog nedovoljne sličnosti u šiljastim proteinima koji su glavni imunogeni proteini koronavirusa (ERLES i BROWNLIE, 2008.).

Visoki stupanj istovjetnosti aminokiselinskog sastava proteina šiljastog nastavka i posljedična unakrižna imunološka zaštita sugerira da bi jedan CRCoV izolat kao antigen u cjepivu, bio dostatan za zaštitu od drugih sojeva (MITCHELL i sur., 2013.).

Kontroliranje samog CIRDC uključuje cijepljenje i poboljšanje uvjeta u skloništima za životinje i uzgajvačnicama kao što su provođenje zdravstvenih mjera, kontrola gustoće naseljenosti, ventilacija i postupci karantene (LEROITH i sur., 2012.).

2.13. JAVNO ZDRAVSTVO

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o prijenosu CRCoV na čovjeka, stoga CRCoV nema značaj po pitanju javnog zdravstva.

Koronavirusi relativnom lakoćom sposobni su prilagoditi se na novi okoliš pomoću mutacija i rekombinacija stoga su prijete koronavirusa stalne i dugoročne (LI i sur., 2006.; GRAHAM i BARIC, 2010.; LI, 2013.). Poznavajući virologiju koronavirusa te kontroliranje njihovog širenja ima bitnu ulogu na globalno zdravlje i ekonomiju (LI, 2016.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 UZORKOVANJE

U ovom istraživanju korišteni su uzorci 258 pasa koji su zaprimljeni u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iako se nastojalo od svake životinje skupiti obrisak nosa i obrisak ždrijela, ponekad to nije bilo moguće. Navedeno prikupljanje i obrada uzoraka provodila se od 2018. do 2021. godine. Uzorci su uzeti psima zaprimljenima na Kliniku za zarazne bolesti i Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Cilj je bio prikupiti što više obrisaka jedinka koje pokazuju kliničke znakove CIRDC ali i psima koji nisu imali kliničke znakove CIRDC. Osim klinika na Veterinarskom fakultetu, u 2019. i 2021. godini, prikupljeni su obrisci nosa i ždrijela pasa u Skloništu za nezbrinute životinje grada Zagreba "Dumovec".

3.2 MOLEKULARNA METODA DOKAZA UZROČNIK

Molekularna metoda RT-PCR korištena je za dokazivanje prisutnosti CRCoV preko umnažanja genoma virusa. Za RT-PCR korištena je RNK izolirana iz obrisaka nosa i ždrijela zasebno ili nosa i ždrijela iste životinje zajedno.

3.2.1. PRIPREMA UZORAKA

Svi uzorci zaprimljeni su u obliku obrisaka nosa i ždrijela. Kraj štapića s kojim je bris uzet, odrezao se škarama u eppendorf epruvetu. Za rezanje obrisaka od svake životinje, koristile su se čiste škare. Nakon rezanja briseva, u eppendorf epruvete dodavala se puferirana solna otopina u količini 700 µl. Dodavanje puferirane solne otopine provodio se u biozaštitnoj komori. Eppendorf epruveta skupa sa brisom i puferiranom solnom otopinom, kratko se promiješala na tresilici, a zatim se centrifugirala 15 sekundi na 6000 okretaja.

3.2.2 IZDVAJANJE VIRUSNE RNK

Pri izdvajanju ukupne virusne RNK koristio se komercijalni komplet QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Tablica 1. Sastav kompleta QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250)

QIAamp cador Pathogen Mini Kit	250
QIAamp male kolumne za centrifugiranje	250 komada
Sakupljačice (2ml)	1000 komada
Puferska otopina VXL	30 ml
Puferska ACB (koncentrirana)	60 ml
QIAGEN Proteinaza K	6 ml
Carrier RNA (poly A)	310 µg
Puferska otopina AW1 (koncentrirana)	98 ml
Puferska otopina AW2 (koncentrirana)	81 ml
Puferska otopina AVE	2x20 ml

3.2.3. POSTUPAK IZVOĐENJA PRETRAGE LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE

Za izvođenje RT-PCR metode koristili su se sljedeći reagensi:

- voda slobodna od RNK-za (QIAGEN)
- reakcijski pufer 5x koncentriran
- 25 mM dNTP
- početnice F2 – R1
- One Step Enzym 2µ/reaction (QIAGEN)

Tablica 2. Početnice za umnažanje odsječka genoma S proteina CRCoV korištene za izvođenje RT-PCR metode

F2	TGCAGCATGTAAATCACAGT
R1	GGCAACACTTTGATACCATT

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za izvođenje RT - PCR metode

REAGENS	KOLIČINA ZA JEDAN UZORAK
Voda (slobodna od RNK-za)	2,2 μ l
Pufer 5x	1 μ l
dNTP (10 mM)	0,2 μ l
Početnica F2	0,2 μ l
Početnica R1	0,2 μ l
One Step Enzym 2 μ /reaction	0,2 μ l

Reagensi korišteni prilikom pripremljanja reakcijske smjese za izvođenje RT-PCR metode, pomiješali su se u eppendorf epruveti. Količina reagensa varirala je ovisno o broju uzoraka koji su bili namijenjeni za RT-PCR. Eppendorf epruveta se zatim kratko promiješala na tresilici te kratko centrifugirala. Nakon toga je reakcijska smjesa podijeljena u PCR Eppendorf epruvetice. Svaka PCR Eppendorf epruvetica morala je sadržavati 4 μ l reakcijske smjese i 1 μ l izdvojene RNK svakog pojedinog uzorka. Pripremljene PCR Eppendorf epruvetice posložile bi se u PCR uređaj koji je bio namješten na sljedeći protokol i temperature:

TEMPERATURA	VRIJEME	
50°	30 min	
95°	15 min	
94°	30 s	} 45 X
49°	1:30 min	
72°	30 s	
72°	9 min	
10°	∞	

3.2.4 ELEKTROFOREZA U GELU

Elektroforeza u gelu je metoda kojom se provjerava uspjeh prepisivanja i umnažanja virusnog genoma pretraživanih uzoraka. Kod elektroforeze dolazi do kretanja električki nabijenih čestica u otopini pod djelovanjem električnog polja. Utjecajem električnog polja čestice različite mase i naboja pređu različitu duljinu u agaroznom gelu za isto vrijeme.

Oprema, pribor i reagensi

- kalup za gel
- češljic za tvorbu jažica u gelu
- analitička vaga (PB153) (Mettler Toledo, Kusunacht, Švicarska)
- TAE pufer
- agaroz (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- mikrovalna pećnica (MO 17 MW) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Eppendorf pipeta 20 μ l
- boja za gel (Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- sustav za provođenje elektroforeze (Scie-Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- izvor električne struje (CS-300V) (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- uređaj za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio-Rad, Hercules, California, SAD)
- marker DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- DNA Loading Buffer (6x) (Lonza, Rockland, Maine, SAD)

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)

Prvi korak je 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. Potom se 242 g Tris baze otopi u 750 ml redestilirane vode, te se doda 57ml 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 110 ml TAE pufera koncentriranog 50x i 490 ml destilirane vode.

3.2.4.2. PRIPREMA GELA ZA ELEKTROFOREZU

Pri pripremi gela najprije se složio kalup za gel, koji je sadržavao gumene stranice da spriječe izlijevanje otopine gela, te sam kalup odnosno plastičnu podlogu u dvije veličine. U kalup su se umetnuli i češljici za tvorbu jažica. Pri izradi malog gela gdje se koristila mala podloga, umetnut je jedan češljic, dok kod velikog gela gdje se koristila velika podloga, umetnuta su dva češljica. Sveukupno veliki gel sadržavao je 40 jažica, dok mali 20 jažica. Ovisno o broju uzoraka koji su bili podvrgnuti RT-PCR-u odnosno elektroforezi odlučilo se hoće li se koristiti mali ili veliki gel. Nakon pripremljenog kalupa, pristupalo se pripremi same otopine za gel. Za veliki gel se u Erlenmayerovu tikvicu dodalo 75 mL pufera TAE koncentriranog 1x te se pomoću analitičke vage odvagunulo 0,75 g agaroze koja se dodala u tikvicu s puferom. Zatim se tikvica stavila u mikrovalnu pećnicu i zagrijavala 3 minute, pri čemu je otopina postala bistra. Otopina se hladila par minuta do 50° C i zatim se dodala boja za gel u količini od 5 µl. Nakon dodavanja boje i laganog mješanja, otopina se izlila u prvotno pripremljen kalup za gel i ostavila na sobnoj temperaturi zaštićenoj od svjetlosti da se hladi. Za mali gel koristile su se količine od 50 mL pufera, 0,5 g agaroze i 3 mikrolitara boje. Nakon hlađenja i polimerizacije gela, izvadili su se češljici i makle gumene stranice s rubova kalupa. Kalup s gelom uronio se u kadu za elektroforezu koja je cijela napunjena TAE – puferom s ciljem da pufer u potpunosti prekrije gel, te je strana gela s jažicama bila usmjerena prema katodi.

3.2.5. NANOŠENJE UZORAKA U GEL I POSTUPAK ELEKTROFOREZE

U svaku PCR Eppendorf epruveticu koja je sadržavala RT-PCR produkt namijenjen elektroforezi, dodalo se 3 mikrolitara boje (DNA Loading Buffer (6x)) te se lagano pomiješalo aspiriranjem pomoću Eppendorf pipete. Istom tom pipetom pomiješani uzorak s bojom nanio se u jažicu pazeći na redoslijed. U posljednje dvije jažice nanese su pozitivna i negativna kontrola, a jedna jažica u sredini ili na kraju reda jažica treba biti namijenjena za DNA marker. Kadica ispunjena TAE puferom u koju se uronio gel, spojila se na istosmjernu struju napona 100 V, jačine 700 mA i snage 150 W, te je postupak trajao 30 minuta. Kada je elektroforeza završila, gel se izvadio iz kadice i prenesao u uređaj za snimanje gela. Veličina dobivenih

odsječaka procjenjivala se usporedbom položaja dobivenog fragmenta s DNA markerom. Prisutnost umnoženog fragmenta odgovarajuće veličine označavala je uspješan dokaz uzročnika PCR metodom.

3.3. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA PROIZVODA RT- PCR

Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda RT – PCR, učinjeno 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. Početnice koje su korištene, bile su iste kao u opisanom RT-PCR.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za potrebe rada korištene su metode deskriptivne statistike. Pri statističkoj obradi podataka korišten je Fisherov točni test uz razinu značajnosti $p=0,05$.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju uzorci su skupljani od 2018. do 2021. godine te je obuhvaćeno 258 pasa. Od 258 pasa, 88 pasa je bilo je iz skloništa za nezbrinute životinje grada Zagreba "Dumovec" gdje su psi bili uzorkovani dva puta, od čega je 30 pasa uzorkovano 2019. godine dok je 58 pasa uzorkovano 2021. godine. Ostalih 170 pasa imalo je privatne vlasnike.

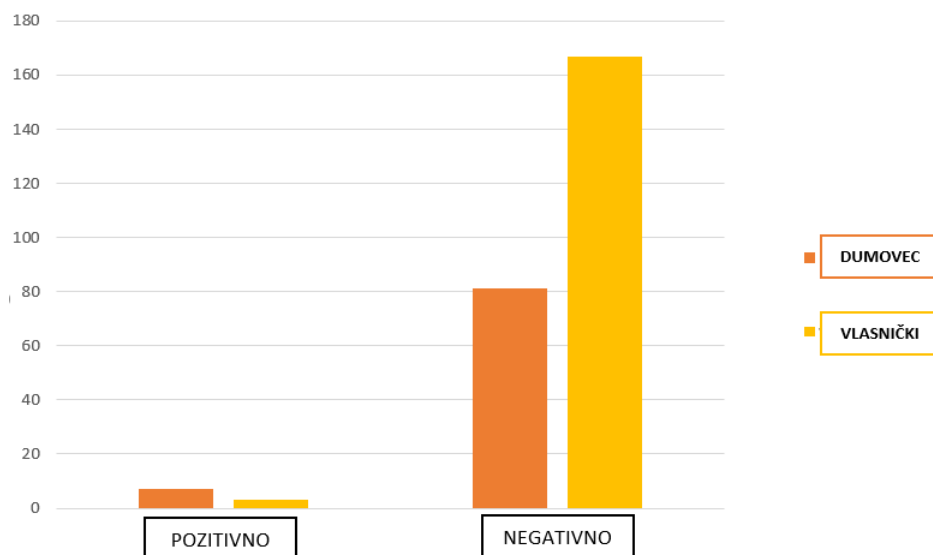
Bila je prisutna velika pasminska raznolikost, od čega su prevladavali mješanci (64,7%), zatim malteški psi (3,4%), labrador retriver (2,3%) i gubičar patuljasti (1,9 %). Ženskih jedinki bilo je 120, a muških 137, dok od jedne jedinke spol nije bio poznat. Kod 68 pasa, prilikom uzimanja obrisaka, bili su prisutni klinički znakovi oboljenja dišnog sustava, kao što su kašalj, otečeno ždrijelo, iscjedak iz nosa ili očiju, te pooštren dišni šum, dok je 14 jedinki imalo kliničke znakove kroz dva tjedna prije uzimanja obrisaka. Od 258 pasa, 10 njih bilo je pozitivno (3,87%).

Prevalencija CRCoV kod pasa iz skloništa (7,95%) bila je viša od prevalencije CRCoV kod vlasničkih pasa (1,76%). Statističkom analizom ustanovljeno je da je ova razlika u prevalenciji statistički značajna ($p = 0,0344$). Također ustanovljeno je da godina uzimanja uzoraka statistički značajno utječe na prevalenciju CRCoV infekcije u skloništu ($p = 0,0057$). U 2019. godini prevalencija CRCoV kod pasa iz skloništa iznosila je 20% , dok je u 2021. iznosila 1,7%.

Tablica 4. Broj pasa uključenih u istraživanje, podijeljeno na pozitivne i negativne na CRCoV, te vlasničke pse i pse iz skloništa

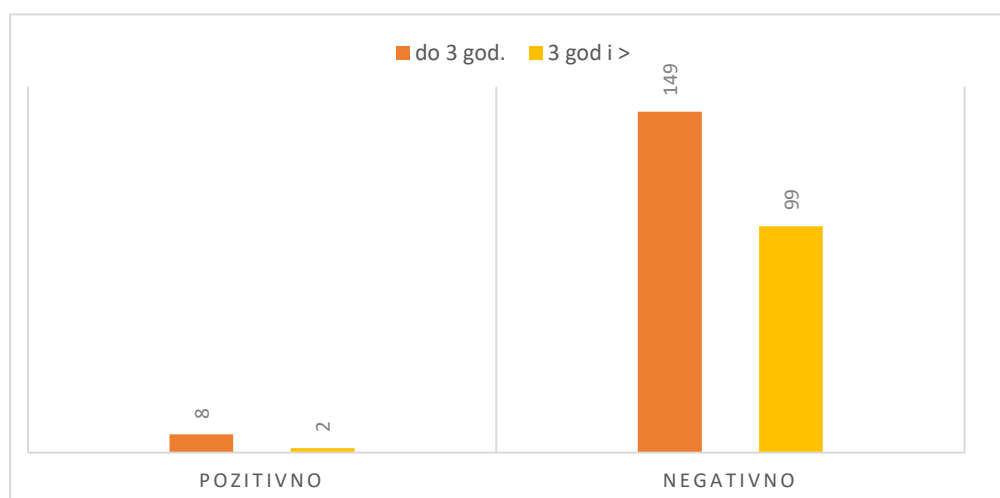
	DUMOVEC	VLASNIČKI PSI	UKUPNO
CRCoV POZITIVNI	7	3	10
CRCoV NEGATIVNI	81	167	248
UKUPNO	88	170	258

Grafikon 1. Zastupljenost vlasničkih pasa i pasa iz skloništa kod CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinka.



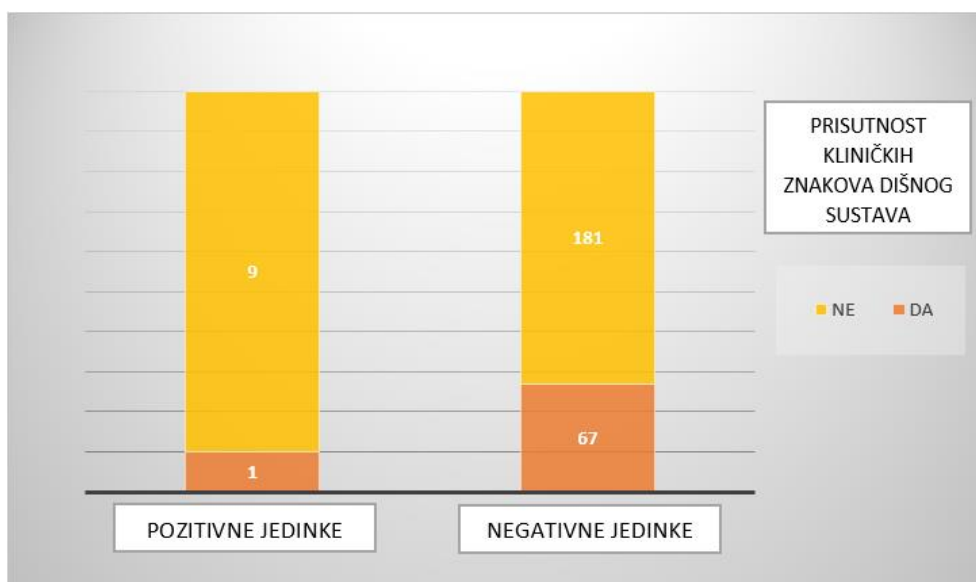
Pasminsku predispoziciju nije bilo moguće utvrditi zbog nedovoljnog broja jedinka određene pasmine, te prilikom podjele pasa na mješance i čistokrvne pasmine, nije utvrđen značaj ($p = 0,1039$). Kod dobi, psi su podijeljeni na mlađe od tri godine i starije od tri godina uključujući one jedinke čija je starost tri godine, ali dob nije imala značajan utjecaj na ishod PCR testa ($p = 0,324$). Isto kao i dob, spol nije imala značaj ($p = 0,1962$).

Grafikon 2. Zastupljenost pozitivnih i negativnih jedinka na CRCoV u odnosu na njihovu starost.



Od 68 pasa s kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava, samo je jedna jedinka bila pozitivna (1,47%), dok je kod 190 pasa bez kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava, njih 9 bilo pozitivno (4,73 %). Promjene na dišnom sustavu vidljive rendgenogramom bile su prisutne samo kod jedne pozitivne jedinice, dok kod druge pozitivne jedinice nije bilo promjena. Kod ostalih osam pozitivnih pasa rendgenogram nije učinjen, te moguće promjene na njihovom dišnom sustavu nisu poznate. Utvrđeno je da prisutnost kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava ($p = 0,4628$) i promjene na dišnom sustavu vidljive rendgenogramom ($p = 0,4972$) nisu značajne.

Grafikon 3. Zastupljenost kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava kod CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinica.



5. RASPRAVA

Virus CRCoV jedan je od mikroorganizama povezanih s CIRDC, a prvi puta je opisan tek 2003. godine (ERLES i sur., 2003.). Ovo je prvo istraživanje u kojem se molekularnom metodom RT-PCR, CRCoV dokazao u Republici Hrvatskoj. U ovom istraživanju cilj je bio ustanoviti prevalenciju CRCoV i njegov značaj kod pasa sa znakovima oboljenja dišnog sustava.

Od 258 pasa koji su bili uključeni u istraživanje, njih 10 bilo je pozitivno na CRCoV te je prevalencija iznosila 3,87%. Uspoređujući rezultate iz drugih država prevalencija CRCoV u Hrvatskoj je niža. Primjerice u Italiji je prevalencija 8,97% (DECARO i sur., 2016.), u Austriji 8,8% (SPISS, 2012.) i 9,8% u Njemačkoj (SCHULZ i sur., 2014.). Kod SPISS (2012.), korišteni su uz obriske ždrijela i obrisci konjunktiva. Isit autor je koristio PCR u stvarnom vremenu (*engl.* quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction - qRT-PCR). Kod DECARO i sur. (2016.) i SCHULZ i sur. (2014.) također je korišten qRT-PCR, ali s obzirom da qRT-PCR nije osjetljiviji od RT – PCR (BASTIEN i sur, 2020.), to ne bi trebalo imati ulogu. Početnice korištene u ovom istraživanju dizajnirane su da ciljaju konzervirane odsječke RNK S proteina, te su se razlikovale od početnica korištenih kod SPISS (2012.) gdje su početnice dizajnirane za RdRp, te kod SCHULZ i sur. (2014.) gdje su koristili početnice za HE. Potrebno je ispitati osjetljivost i specifičnost različitih molekularnih metoda da bi se utvrdilo koja od njih daje maksimalnu pouzdanost dokaza uzročnika. Osobito ako se zna da su koronavirusi izrazito skloni mutacijama, a broj dostupnih sekvenci u banci gena je mali. Najvjerojatniji uzrok uočene razlike u prevalenciji u ovom istraživanju je vrijeme uzorkovanja. Dokazana je izrazita sezonost infekcije CRCoV, koji se češće javlja u zimskim mjesecima (ERLES i BROWNLIE, 2005.). Za razliku od ranije navedenih istraživanja, uzorci za potrebe ovog istraživanja uzimani su tijekom cijele godine, a samo su psi u skloništima su uzorkovani dvokratno, 2019. i 2021. godine. Upravo kod ovih pasa dokazana je statistički značajna razlika ovisno o vremenu uzorkovanja.

Od obrisaka pasa koji su imali kliničke znakove oboljenja dišnog sustava, samo je jedan pas bio pozitivan na CRCoV, odnosno prevalencija je iznosila 1,47%. Kod istraživanja iz 2013. gdje je opisana pokusna infekcija CRCoV, zaključeno je da se virus obilno izlučuje drugi dan nakon zaraze i završava već šestog dana (MITCHELL i sur., 2013.), a s obzirom da je CIRDC multikauzalan i CRCoV nije jedini patogen povezan s dišnom bolešću, klinička slika CIRDC obično traje duže od šest dana odnosno do dva tjedna (REAGEN i SYKES 2020.). Kod uzorkovanja pasa s kliničkim znakovima oboljenja dišnog sustava, moguće je da jedinka više

ne izlučuje virus ovisno o danu bolesti uzet obrisak. Ovo je osobito značajno ako se zna priroda kliničkog očitovanja CIRDC. Bolest je gotovo po pravilu blagog tijeka u početku te većina vlasnika ne odlazi kod veterinara u tom periodu. Također smatra se da virus CRCoV ima sezonsku pojavnost te se češće javlja u zimskim mjesecima nego ljeti (ERLES i BROWNLIE, 2005.), pa je godišnje doba uzorkovanja moglo utjecati na prevalenciju infekcije uzevši u obzir da su se obrisci skupljali tokom cijele godine, a ne samo tokom zimskih mjeseca. Ostale pozitivne jedinke nisu imale kliničke znakove oboljenja dišnog sustava, te je prevalencija CRCoV njih iznosila 4,7 %, čime se može zaključiti kako je infekcija CRCoV blagog kliničkog tijeka i kako su za razvoj kliničkih znakova CIRDC potrebni i drugi patogeni ili oslabljeni imunitet jedinke. U istraživanju u Njemačkoj, kod 90 zdravih pasa, niti jedna jedinka nije bila pozitivna na CRCoV (SCHULZ i sur., 2014.), ali u ovom istraživanju psi bez kliničkih znakova dišnih bolesti zaprimljeni su na klinike Veterinarskog fakulteta zbog neke druge bolesti, što je moglo utjecati na njihov imunitet te ih predisponirati samoj zarazi.

U istraživanje su bili uključeni i psi iz skloništa za životinje, njih 88. Mjesta gdje puno pasa boravi, sklona su izbijanju CIRDC (BUONAVOGLIA i MARTELLA, 2007.; MOCHIZUKI i sur., 2008.; SINGLETON i sur., 2019.) pa je bilo za očekivati veću prevalenciju kod te grupe nego kod vlasničkih pasa. Psi u uzgajivačnicama, skloništima i trgovinama za kućne ljubimce izloženi su povećanom riziku od CIRDC zbog povećane gustoće populacije i priljeva novih životinja i patogena zbog velikog prometa životinja i ponekad neadekvatnih uvjeta (APPEL i PERCY, 1970.; BEMIS i sur., 1977.). Prevalencija CRCoV kod pasa iz skloništa, u ovom istraživanju, iznosila je 7,95%, i bila je statistički značajno veća nego kod vlasničkih pasa gdje je iznosila 1,76%. Ovo potvrđuje tezu da je CRCoV rasprostranjen i učestaliji kod ove skupine pasa i u Hrvatskoj (ERLES i sur., 2003.).

Uzorkovanje pasa iz skloništa provelo se 2019. i 2021. godine, te, kako je ranije navedeno, vrijednost prevalencije infekcije se statistički značajno razlikovala. Prevalencija CRCoV kod pasa iz skloništa 2019. godine iznosila je 20%, dok je u 2021. iznosila 1,7%. Na tako veliku razliku može se pretpostaviti da je utjecalo vrijeme uzimanja obrisa, jer 2019. godine kad je prevalencija mnogo viša, životinje su bile uzorkovane u veljači odnosno za vrijeme zime, a 2021. godine obrisci su skupljani krajem rujna. Kao što je već spomenuto CRCoV ima češću pojavnost u zimskim mjesecima u odnosu na ljetne, a između dva uzorkovanja u ovom istraživanju u skloništu se nisu značajno mijenjali brojnost pasa, uvjeti držanja te mjere opće i specifične profilakse zaraznih bolesti.

Kod pozitivnih jedinki prevladavali su psi ženskog spola, ali spol nije imao statistički značajan utjecaj na rezultat RT - PCR pretrage. Isto kao i spol, dob također nije imala značaj. Ta su saznanja usklađena sa istraživanjem iz Švedske gdje je utvrđeno da spol, dob i pasmina nemaju utjecaja kod akutne infekcije CRCoV (WILLE i sur., 2020.). Zanimljivo je da je kod istraživanja seroprevalencije CRCoV dob bila značajni čimbenik rizika (PRIESTNALL i sur., 2006.; PRIESTNALL i sur., 2007.). Ovo istraživanje snažno govori u prilog da dob nije intrinzički čimbenik za infekciju CRCoV već da stariji psi imaju više kontakata tijekom života i veću mogućnost izlaganju CRCoV.

Zaključno, CRCoV je nepobitno prisutan u Republici Hrvatskoj i to osobito u pasa u skloništima za nezbrinute životinje. Ovo je značajan podatak jer može usmjeravati mjere opće profilakse koje bi zaštitile zdravlje pasa. Iako ovo istraživanje govori u prilog da je infekcija CRCoV u terenskim uvjetima blaga ili subklinička, s obzirom da je u ovom istraživanju bio zastupljeniji kod životinja bez kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava značaj ovog virusa je potrebno dalje pratiti kao i njegovu ulogu u sinergizmu s drugim mikroorganizmima kod CIRDC, s obzirom da je CIRDC jedna od najučestalijih zaraznih bolesti pasa. Ovo je ponovno osobito važno u skloništima za nezbrinute životinje u kojima zbog velikog broja skupno držanih pasa, uvjeta držanja te stresa infekcija CRCoV može biti značajan predisponirajući čimbenik za teška oboljenja dišnog sustava. Završno, koronavirusi su skupina virusa izrazito sklonih mutacijama, pa proširenost i molekularnu epizootologiju CRCoV treba nastaviti pratiti i istraživati jer pojava novih sojeva može značiti i teže kliničke oblike bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju je po prvi puta u 3,87% pasa u Republici Hrvatskoj dokazano prisustvo virusa CRCoV molekularnom metodom RT-PCR.
2. Prevalencija infekcije je značajno viša u skloništima za nezbrinute životinje i dosegala je 20%.
3. Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da ne postoji niti dobna niti spolna predispozicija za infekciju CRCoV.
4. Izražena je sezonost pojave CRCoV i infekcija se javlja češće u zimskim mjesecima.
5. Infekcija CRCoV dovodi ili do blage kliničke slike ili je u svom tijeku subkličička u terenskim uvjetima.

7. LITERATURA

ABOUBAKR H. A., T.A. SHARAFELDIN, S.M. GOYAL (2020): Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review

APPEL, M. J., D. H. PERCY (1970): SV-5-like parainfluenza virus in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 156, 1778-1781.

APPEL, M. J., L. N. BINN (1987): Canine infectious tracheobronchitis. In: *Virus Infections of Carnivores* (Appel, M. J., Ed.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 201-211.

BASTIEN, P., G.W. PROCOP, U. REISCHL (2020): Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR

BELOUZARD, S., J.K. MILLET, B. N. LICITRA, G.R. WHITTAKER (2012): Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein

BEMIS, D.A., L.E. CARMICHAEL, M.J.G. APPEL (1977): Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*, *Cornell Vet.* 67:282–293.

BUONAVOGLIA, C., V., MARTELLA (2007): Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38, 355–373.

CASANOVA, L. M., S. JEON, W.A. RUTALA, D.J. WEBER, M.D. SOBSEY (2010): Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and Environment Microbiology*, **76**(9), 2712– 2717.

CRAWFORD, P. C., E. J. DUBOVI, W. L. CASTLEMAN, I. STEPHENSON, E. P. GIBBS, L. CHEN, C. SMITH, R. C. HILL, P. FERRO, J. POMPEY, R. A. BRIGHT, M. J. MEDINA, C. M. JOHNSON, C. W. OLSEN, N. J. COX, A. I. KLIMOV, J. M. KATZ, R. O. DONIS (2005): Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 310, 482-485.

DAY, M. J., S. CAREY, C. CLERCX, B. KOHN, F. MARSILIO, E. THIRY, L. FREYBURGER, B. SCHULZ, D. J. WALKER (2020): Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe, *J. Comp. Pathol.* 176, 86-108.

DECARO, N., C. DESARIO, G. ELIA, V. MARI, M.S. LUCENTE, P. CORDIOLI, M.L. COLAIANNI, V. MARTELLA, V., C. BUONAVOGLIA (2007): S Serological and molecular

evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Veterinary Microbiology* 121, 225-230

DITCHFIELD, J., L. W. MACPHERSON, A. ZBITNEW (1962): Association of Canine Adenovirus (Toronto A 26/61) with an Outbreak of Laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A Preliminary Report. *Can. Vet. J.* 3, 238-247.

DUAN, S. M., X. S. ZHAO, R. F. WEN, J. J. HUANG, G. H. PI, S. X. ZHANG, J. HAN, S.L. BI, L. RUAN, X.P. DONG, SARS Research Team. (2003): Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 16(3), 246.

ELLIS, J.A., N. MCLEAN, R. HUPAELO, D.M. HAINES (2005): Detection of coronavirus in cases of tracheobronchitis in dogs: a retrospective study from 1971 to 2003. *Can Vet J* 2005;46:447–8.

EMERY, J.B., J.A. HOUSE, J.L. BITTLE, A.M. SPOTTS (1976): A canine parainfluenza viral vaccine: immunogenicity and safety. *American Journal of Veterinary Research*, 37, 1323 – 1327.

ERLES, K., C. TOOMEY, H. W. BROOKS, J. BROWNLIE (2003): Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology* 310, 216-223.

ERLES, K., J. BROWNLIE (2005): Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. *Arch. Virol.* 150, 1493–1504.

ERLES, K., J. BROWNLIE (2008): Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. *Vet. Clin. N. A.: Small Anim. Pract.* 38, 815–825.

FRIEMAN, M., R. BARIC (2008): Mechanisms of severe acute respiratory syndrome pathogenesis and innate immunomodulation. *Microbiol Mol Biol Rev.*;72:672–685.

GRAHAM R.L., R.S. BARIC (2010): Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* 84:3134–46 13

GREENE, C.E. (2012): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*; fourth edition

GUNDY, P. M., C. P. GERBA, I. L. PEPPER (2009): Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 10.

HIEBL, A., A. AUER, G. BAGRINOVSKI, M. STEJSKAL, R. HIRT, T. RÜMENAPF, A. TICHY, F. KÜNZEL (2019): Detection of selected viral pathogens in dogs with canine infectious respiratory disease in Austria *Journal of Small Animal Practice*, 60, pp. 594-600

HOFMANN, H., K. HATTERMANN, A. MARZI, T. GRAMBERG, M. GEIER, M. KRUMBIEGEL, S. KUATE, K. ÜBERLA, M. NIEDRIG, S. PÖHLMANN (2004): S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *J. Virol.* 78 (12), 6134–6142.

KAMPF G., D. TODT, S. PFAENDER, E. STEINMANN (2020): Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents

KANESHIMA, T., T. HOHDATSU, K. SATOH, T. TAKANO, K. MOTOKAWA, H. KOYAMA (2006): The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 21–25.

KANESHIMA, T., T. HOHDATSU, R. HAGINO, S. HOSOYA, Y. NOJIRI, M. MURATA, T. TAKANO, M. TANABE, H. TSUNEMITSU, H. KOYAMA (2007): The Infectivity and Pathogenicity of a Group 2 Bovine Coronavirus in Pups

KARPAS, A., F. G. GARCIA, F. CALVO, R. E. CROSS (1968): Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 29, 1251–1257.

KIRCHDOERFER, R.N., C.A COTTRELL, N. WANG, J. PALLESEN, H.M. YASSINE, H.L. TURNER, K. S CORBETT, B.S. GRAHAM, J.S. MCLELLAN A.B. WARD (2016): Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531 (7592), 118–121.

KNESL, O., F.J. ALLAN, S. SHIELDS, (2009): The seroprevalence of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in dogs in New Zealand. *N.Z. Vet. J.* 57, 295–298.

KONTOR, E.J., R.J. WEGRZYN, R.A. GOODNOW (1981): Canine infectious tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine parainfluenzaeBordetella bronchiseptica vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). *American Journal of Veterinary Research*, 42, 1694 – 1698

LAPPIN, M.R., J. BLONDEAU, D. BOOTHE, E.B. BRIETSCHWERDT, L. GUARDABASSI, D.H. LLOYD, M.G. PAPICH, S.C. RANKIN, J.E. SYKES, J. TURNIDGE, J.S. WEESE (2017): Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 279 – 294

LEROITH, T., P. PINEYRO, M.D. VIESON (2012): A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 3, 25 - 39.

LI, F. (2013): Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antivir. Res.* 100:246– 54

LI, WH, S.K. WONG, F. LI, J.H. KUHN, I.C. HUANG, H. CHOE, M. FARZAN (2006): Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2–S-protein interactions. *J. Virol.* 80:4211–19

LI, F. (2016): Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins Department of Pharmacology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota 55455

MACLACHLAN, N. J., E. J. DUBOVI (2010): *Fenner's Veterinary Virology*; fourth edition

MITCHELL, J. A., H. W. BROOKS, B. SZLADOVITS, K. ERLES, R. GIBBONS, S.

MITCHELL, J. A., J. M. CARDWELL, H. LEACH, C. A. WALKER, S. LE PODER, N. DECARO, M. RUSVAI, H. EGBERINK, P. ROTTIER, M. FERNANDEZ (2017): European surveillance of emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 212, 31–38.

MOCHIZUKI, M., A. YACHI, T. OHSHIMA, A. OHUCHI, T. ISHIDA (2008): Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 563-569.

MORE, G., M. DUNOWSKA, E. ACKE, N. CAVE (2019): A serological survey of canine respiratory coronavirus in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 68(1), 54–59.

NAQVI, A.A.T., K. FATIMA, T. MOHAMMAD, U. FATIMA, I.K. SINGH, A. SINGH, S.M. ATIF, G. HARIPRASAD, G.M. HASAN, M.I. HASSAN (2020.): Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta. Mol. Basis Dis.* 1866(10), 165878.

PAYNE, S. (2017): *VIRUSES*; first edition

PRIESTNALL, S.L., A. PRATELLI, J. BROWNLIE, K. ERLES (2007): Serological prevalence of canine respiratory coronavirus in southern Italy and epidemiological relationship with canine enteric coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 176–180

PRIESTNALL, S.L., J. BROWNLIE, E.J. DUBOVI, K. ERLES (2006): Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.* 115, 43–5

PRIESTNALL, S.L., J.A. MITCHELL, C.A. WALKER, K. ERLES, J. BROWNLIE (2013): New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease

REAGAN, K.L., J.E. SYKES 2020: Canine Infectious Respiratory Disease, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* Volume 50, Issue 2, , Pages 405-418

REHMAN, S.U., L. SHAFIQUE, A. IHSAN, Q. LIU (2020): Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens.* 9(3), 240.

RENSHAW, R. W., N. C. ZYLICH, M. A. LAVERACK, A. L. GLASER, E. J. DUBOVI (2010): Pneumovirus in dogs with acute respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 993-995.

RONSSSE, V., J. VERSTEGEN, K. ONCLIN, A. L. GUIOT, C. AEBERLE, H. J. NAUWYNCK (2002): Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 1997–1998. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 299–304.

RUCH-GULLIE, R., S. MOROFF, M.R. LAPPIN (2016): Adenovirus 2, Bordetella bronchiseptica, and parainfluenza molecular diagnostic assay results in puppies after vaccination with modified live vaccines. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 164 – 166.

SCHULZ, BS., S. KURZ , K. WEBER, HJ. BALZER, K. HARTMANN (2014b): Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections. *Veterinary Journal*, 201, 365 - 369.

SHIELDS, J. BROWNLIE (2013): Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). *Vet. Microbiol.* 162, 582–594.

SINGLETON, D. A., J. STAVISKY, C. JEWELL, S. SMYTH, B. BRANT, F. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, S. AWSON, G. L. PINCHBECK, P. J. M. NOBLE, A. D. RADFORD (2019): Small animal disease surveillance 2019: respiratory disease, antibiotic prescription and canine infectious respiratory disease complex. *Vet. Rec.* 184, 640-645.

SPISS, S. (2012): Enteric and respiratory coronavirus infections in Austrian dogs: serological and virological investigations of prevalence and clinical importance in respiratory and enteric diseases. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 99, 67 - 81.

SU, S., G. WONG, W. SHI, J. LIU, A.C.K. LAI, J. ZHOU, W. LIU, Y. BI, G.F. GAO (2016.): Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24(6), 490-502

THRUSFIELD, M.V., C.G.G. AITKEN, R.H. MUIRHEAD (1991): A field investigation of kennel cough: efficacy of different treatments. *J Small Anim Pract*; 32:455–9.

VERSTEEG, G.A., P.J. BREDENBEEK, S.H. VAN DEN WORM, W.J. SPAAN (2007): Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. *Virology*;351:18–26

WALLS, A.C., M.A. TORTORICI, B.-J. BOSCH, B. FRENZ, P.J.M. ROTTIER, F. DIMAIO, F.A. REY, D. VEESLER (2016): Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 531 (7592), 114–117.

WEISS, S.R., S. NAVAS-MARTIN (2005): Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev*; 69:635–64

WILLE, M., J.J. WENSMAN, S. LARSSON, R. VAN DAMME, A-K. THEELKE, J. HAYER, M. MALMBERG (2020): Evolutionary genetics of canine respiratory coronavirus and recent introduction into Swedish dogs, *Infection, Genetics and Evolution*

WILSON, S., J. ILLAMBAS, E. SIEDEK, A. THOMAS, V. KING, C. STIRLING, E. PLEVOVÁ, J. SALT, G. STURE (2014): The administration of a single dose of a multivalent (DHPPiL4R) vaccine prevents clinical signs and mortality following virulent challenge with canine distemper virus, canine adenovirus or canine parvovirus. *Trials in Vaccinology*, 3, 102 - 106.

YACHI, A., M. MOCHIZUKI (2006): Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2615–2618.

8. SAŽETAK

EPIZOOTIOLOŠKI ČIMBENICI INFEKCIJE RESPIRATORNIM KORONAVIRUSOM PASA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Virus CRCoV, iz porodice betakoronavirusa, prvi je puta opisan početkom 21. stoljeća u Ujedinjenom Kraljevstvu kod pasa smještenih u skloništu za nezbrinute životinje koji su imali kliničke znakove CIRDC. Do danas virus je opisan diljem svijeta te se najčešće povezuje s ranom fazom CIRDC. Glavno mjesto umnažanja CRCoV je dišni sustav, stoga se pretpostavlja da se virus širi izlučevinama dišnog sustava, a širenju doprinose mjesta gdje se nalazi mnogo pasa, poput skloništa za životinje, izložbi za pse i slično.

Ovo je prvo istraživanje u Republici Hrvatskoj u kojem je virus CRCoV bio istraživano. U ovom istraživanju korišteni su obrisci nosa i ždrijela 258 pasa od kojih je dio imao kliničke znakove oboljenja dišnog sustava. Obrisci su zaprimljeni u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te su se 2019. i 2021. godine obrisci skupljali u Skloništu za nezbrinute životinje grada Zagreba "Dumovec". Uzorkovanje i prikupljanje podataka trajalo je od 2018. do 2021. godine.

Virus CRCoV je dokazan u 3,87% pretraživanih pasa. Infekcija je bila znatno češća u pasa u skloništu za životinje, u odnosu na vlasničke pse, a prevalencija je u 2019. godini bila čak 20%. Spol i dob nisu imali značajan utjecaj na rezultate RT - PCR pretrage. Zanimljivo, CRCoV je češće bio dokazan kod pasa bez kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava čime se može zaključiti da CRCoV nije značajan kao samostalan uzročnik dišnih bolesti pasa odnosno CIRDC. Potrebno je nastaviti pratiti pojavnost CRCoV i njegovu ulogu u patogenezi CIRDC s obzirom da je CIRDC jedna od najčešćih zaraznih bolesti pasa.

Ključne riječi : CRCoV, pas, zaraza, CIRDC, prevalencija, RT – PCR, klinički znakovi dišnog oboljenja

9. SUMMARY

EPIZOOTIOLOGICAL FACTORS OF CANINE RESPIRATORY CORONAVIRUS INFECTION IN CROATIA

The CRCoV virus, from the beta-coronavirus family, was first described in the early 21st century. It was diagnosed in dogs with CIRDC in the shelter in the United Kingdom. The virus has been described worldwide and is most commonly associated with early-stage of CIRDC. The principal place of viral replication is the respiratory system, and it is assumed that the virus spreads via the respiratory tract excretions. Places where dog density is high, such as animal shelters, dog shows and similar, contribute to the spread of the virus.

This study is the first study in Croatia in which the CRCoV virus was investigated. The study included nasal and pharyngeal swabs of 258 healthy dogs and dogs with respiratory disease. These swabs were submitted to the Virology Laboratory of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with the Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb. Additionally, dogs at the shelter for abandoned animals of the City of Zagreb "Dumovec" were sampled in 2019 and 2021.

CRCoV virus was detected in 3.87% of tested dogs. There was a significantly higher infection rate in dogs from the animal shelter than privately owned dogs. In 2019 prevalence in shelter dogs was as high as 20%. Gender and age did not significantly affect RT - PCR test results. Interestingly, CRCoV has been more frequently detected in dogs without clinical signs of respiratory disease, which leads to the conclusion that CRCoV is not significant as an independent cause of respiratory diseases in dogs. It is necessary to continue monitoring the occurrence of CRCoV and its role in the pathogenesis of CIRDC, given that CIRDC is one of the most common infectious diseases in dogs.

Keywords: CRCoV, dog, infection, CIRDC, prevalence, RT – PCR, respiratory clinical signs

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. travnja 1997. godine u Rijeci. Pohađala sam OŠ Vladimira Nazora u Pazinu od 2003. do 2011. godine, te sam završetkom osnovne škole upisala Gimnaziju i strukovnu školu Jurja Dobrile u Pazinu smjer opća gimnazija. Završetkom srednje škole, 2015. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tokom druge godine studiranja bila sam aktivni član studentske udruge IVSA, te sam sudjelovala u studentskoj razmjeni u Beču. Za vrijeme studiranja volontirala sam na klinici Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti sa klinikom od 2019. do 2022. godine gdje sam stekla dodatno iskustvo i vještine. Osim na fakultetu, 2019. godine preko ljeto volontirala sam u lokalnoj ambulanti Veterinarska ambulanta Pazin, a stručnu sam praksu odradila 2021. godine u Veterinarskoj ambulanti Šegota u Zagrebu. Tokom svih šest godina studiranja bila sam član odbojkaške ekipe Veterinarskog fakulteta s kojom sam predstavljala fakultet na Sveučilišnoj ligi. Zadnju godinu studiranja radila sam diplomski u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti, gdje sam stekla nove vještine i osnovno znanje o molekularnim metodama.