

EPIZOOTIOLOŠKI ČIMBENICI RIZIKA I KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE SARS-CoV-2 VIRUSOM U PASA I MAČAKA

Miletić, Gorana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:178:930732>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



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

Gorana Miletić

EPIZOOTIOLOŠKI ČIMBENICI RIZIKA I KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE SARS-CoV-2
VIRUSOM U PASA I MAČAKA

Diplomski rad

Zagreb, 2023

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. prof. dr. sc. Nevenka Rudan
3. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. doc. dr. sc. Matko Perharić (zamjena)

Prije svega zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću na ukazanoj prilici izrade istraživačkog rada pod njegovim vodstvom. Hvala mu na povjerenju i strpljenju te neizmjerne količini znanja koje je podijelio kako pri izradi diplomskog rada, tako i prilikom volontiranja na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Željela bih izraziti veliku zahvalnost svim ostalim djelatnicima Virološkog laboratorija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Klinike za zarazne bolesti na nesebičnom dijeljenju znanja i vještina tokom moga studiranja.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Snježani Kovač koja me hrabro vodila kroz laboratorijski dio istraživanja i koja je posvetila veliku količinu vremena i truda, kako bi mi pomogla za vrijeme izrade ovoga rada.

Hvala i prof. dr. sc. Ljubi Barbiću na podršci i nesebičnom dijeljenju savjeta u trenutku kada su isti najviše potrebni.

Veliko hvala i izv. prof. dr. sc. Maji Maurić na pomoći kod statističke obrade podataka.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene kada je bilo najviše potrebno i pokušavali biti najbolja moguća podrška u svakoj situaciji.

Najviše se zahvaljujem roditeljima na emotivnoj i financijskoj potpori, te neizmjernom strpljenju koje su pokazali dok sam lovila vlastite ambicije. Dodatno hvala majci koja mi je kroz svako razdoblje života, puna riječi ohrabrenja, bila kao najbolja prijateljica bez koje ne bih bila što danas jesam.

POPIS KRATICA:

ACE2 - (*engl. Angiotensin Converting Enzyme 2*) - angiotenzin konvertirajući enzim 2

ANOVA - (*engl. analysis of variance*) – analiza varijance

bp - parovi baza

CI - (*engl. confidence interval*) – interval pouzdanosti

CoV - (*engl. Coronavirus*) – koronavirus

COVID-19 - (*engl. Coronavirus Disease 2019*) - koronavirusna bolest 2019

CPU - citopatogeni učinak

DMEM - (*engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) - Dulbeccov modificirani medij Eagle

E protein- (*engl. envelope*) – protein ovojnice

ELISA - (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - imunoenzimski test

FCoV - (*engl. Feline Coronavirus*) – koronavirus mačaka

FCS - (*engl. Fetal calf serum*) - goveđi fetalni serum

FIP - (*engl. feline infectious peritonitis*) – zarazni peritonitis mačaka

HCoV - (*engl. Human Coronaviruses*) - ljudski koronavirusi

HE protein - (*engl. hemagglutinin-esterase*) - membranski protein hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti

ICTV - (*engl. International Committee on Taxonomy of Viruses*) - Međunarodno vijeće za taksonomiju virusa

IgG - imunoglobulini G

IgM - imunoglobulini M

M protein - (*engl. membrane*)- membranski protein

MERS-CoV - (*engl. Middle East Respiratory Syndrome- Coronavirus*) - koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma

N protein - (*engl. nucleoprotein*) – nukleoprotein

NSP - (*engl. Nonstructural Protein*) - nestrukturalni proteini

ORF - (*engl. Open Reading Frames*) - otvoreni okviri za čitanje

OR - (*engl. odds ratio*) – omjer izgleda

PCR - (*engl. Polymerase Chain Reaction*) - lančana reakcija polimeraze

p - vrijednost – razina značajnosti

RBD - (*engl. Receptor Binding Domain*) - područje vezanja receptora

RNK - ribonukleinska kiselina

R_{McF}^2 - McFadden-ov kvadrirani koeficijent determinacije

r_s - Spearmanov koeficijent korelacije

S protein - (*engl. spike*) – šiljasti protein

SARS-CoV - (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus*) – koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma

SARS-CoV-2 - (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome- related Coronavirus 2*) - SARS koronavirus 2

SARSr-CoV - (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Related- Coronavirus*) - koronavirus srodan SARS-u

SVD - standardna virusna doza

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TCID - (*engl. tissue culture infective dose*) – 50% infektivna doza za staničnu kulturu

TMPRSS2 - (*engl. Transmembrane Protease Serin 2*) - serin 2 transmembranska proteaza

VN-test - virus neutralizacijski test

VOC - (*engl. Variant Of Concern*) - zabrinjavajuća varijanta

VOI - (*engl. Variant Of Interest*) - varijanta od interesa

χ^2 - hi kvadrat

5', 3' UTR - (*engl. 5' i 3' Untranslated Region*) - 5' i 3' neprevedena područja

POPIS TABLICA, GRAFIKONA I SLIKA

SLIKE:

Slika 1. Građa virusne čestice.

Slika 2. Građa virusnog genoma.

Slika 3. Globalna proširenost SARS-CoV-2.

Slika 4. Patohistološki nalaz.

Slika 5. Prikaz mikrotitracijske plitice i postavljanja testa.

Slika 6. Jedan sloj E6 Vero stanica.

Slika 7. Izražen je citopatogeni učinak virusa SARS- CoV-2.

Slika 8. Grafički prikaz usporedbe seroprevalencije pasa i mačaka po varijantama.

Slika 9. Logaritamski prikaz razlike visine titrova među varijantama kod pasa i mačaka.

TABLICE:

Tablica 1. Prikaz potrebnih razrijeđenja i vremena inkubacije za pojedine varijante.

Tablica 2. Seroprevalencija po varijantama.

Tablica 3. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova.

Tablica 4. Spolna struktura pozitivnih i negativnih seruma pasa.

Tablica 5. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova pasa i kuja.

Tablica 6. Spolna struktura pozitivni i negativnih seruma mačaka.

Tablica 7. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova mužjaka i ženki mačaka.

Tablica 8. Značaj razlike prevalencije obzirom na kliničku sliku pasa.

Tablica 9. Značaj razlike prevalencije obzirom na kliničku sliku mačaka.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. POVIJEST	2
2.2. ETIOLOGIJA	3
2.2.1. GRAĐA VIRUSNE ČESTICE	3
2.2.2. GRAĐA GENOMA	4
2.3. TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA	5
2.4. TENACITET	7
2.5. PROŠIRENOST	8
2.6. EPIZOOTIOLOGIJA	10
2.7. PATOGENEZA	11
2.8. KLINIČKA SLIKA	12
2.9. PATOANATOMSKI I PATOHISTOLOŠKI NALAZ	12
2.10. DIJAGNOSTIKA	14
2.11. LIJEČENJE	14
2.12. IMUNOPROFILAKSA	15
2.13. JAVNO ZDRAVSTVO	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. ODABIR UZORAKA	18
3.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA	18
3.3. DOKAZ PRISUTNOSTI PROTUTIJELA ZA SARS-CoV-2	18
3.4. OPIS POSTUPKA	19
3.4.1. MATERIJALI	19
3.4.2. IZVOĐENJE POSTUPKA	20
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	24
4. REZULTATI	25
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČCI	38
7. LITERATURA	39
8. SAŽETAK	48
9. SUMMARY	49
10. ŽIVOTOPIS	50

1. UVOD

U prosincu 2019. na području Wuhana, Kine, zabilježena je cirkulacija novog koronavirusa (*engl. Coronavirus - CoV*) koja će se kasnije pretvoriti u jednu od najznačajnijih pandemija zabilježenih u povijesti čovječanstva (SINGH i YI, 2021.).

Koronavirusi su velika porodica virusa koja uzrokuje respiratorne i probavne infekcije kod životinja i ljudi. U prošlosti nisu smatrani visoko patogenim za ljude sve do pojave koronavirusa teškog akutnog respiratornog sindroma (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus – SARS-CoV*) 2002. godine i koronavirusa bliskoistočnog respiratornog sindroma (*engl. Middle East Respiratory Syndrome- Coronavirus – MERS-CoV*) 2012. godine (KIM i sur, 2020.). Nakon njih pojava novih koronavirusa s pravom se smatra javnozdravstvenom prijetnjom 21. stoljeća (HU i sur, 2021.). Tome doprinosi i činjenica da je velik broj divljih i domaćih životinja prijemljiv na određene koronaviruse što ih može činiti posrednim domaćinom i rezervoarom virusa (HASOKSUZ i sur, 2020.; LORUSSO i sur., 2020.). Tako se za SARS-CoV smatra da je na ljude prešao sa cibetki, prodavanih na živim tržnicama u Kini, koje su dokazano posredni domaćin. Dok se posrednim domaćinom MERS-CoV-a smatraju jednogrbne deve sa kojih je virus prešao na ljude u području Saudijske Arabije (HASOKSUZ i sur, 2020.). SARS koronavirus 2 (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2– SARS-CoV-2*) novi je koronavirus koji je po broju zaraženih i proširenosti u svijetu otišao daleko dalje od SARS-CoV-a i MERS-CoV-a. Njegov najbliži srodnik je koronavirus šišmiša imenovan „RaTG13“, čiji se genetski slijed poklapa sa nukleotidnim slijedom SARS-CoV-2 u 96,2%. Tako visoka genetska sličnost potkrepljuje hipotezu da je SARS-CoV-2 na ljude izvorno prešao sa šišmiša (BAČENKOVA i sur., 2021.; HU i sur, 2021.). Sam virus u ljudi uzrokuje bolest danas poznatu kao koronavirusna bolest 2019 (*engl. Coronavirus Disease 2019 – COVID-19*). Bolest se manifestira od asimptomatski i blažih simptoma sve do teškog oblika s mogućim letalnim ishodom. Kako se globalno brzo širi, Svjetska zdravstvena organizacija ju je proglasila javnozdravstveno hitnom situacijom od međunarodnog značaja i pozvala stotine istraživača da razvijaju dijagnostiku, liječenje i imunoprofilaksu s ciljem što bržeg otkrivanja i kontrole bolesti. Upravo iz tog razloga trebalo bi što prije odgovoriti na pitanja vezana za etiologiju, patogenost i puteve širenja (ESAKANDARI i sur, 2020.).

Veterinari imaju veliku ulogu u javnom zdravstvu („One health pristup“) gdje je osnovni cilj zdravlje i dobrobit ljudi (LORUSSO i sur., 2020.). Uzimajući u obzir prethodno navedene

činjenice postaje jasno da na mnoga pitanja treba odgovoriti i s aspekata veterinarske medicine (ISLAM i sur., 2022.a). Obzirom na veliki značaj životinja u epidemiologiji bolesti ljudi postavlja se pitanje koliki je stvarni utjecaj kućnih ljubimaca na širenje SARS-CoV-2. Cilj ovog istraživanja je pružiti odgovore na neke od tih pitanja. Istražit će se sama prijemljivost pasa i mačaka na SARS-CoV-2, moguća klinička očitovanja te njihov javnozdravstveni utjecaj.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. POVIJEST

Prije pojave SARS i MERS koronavirusa, četiri ljudska koronavirusa (*engl. Human Coronaviruses* - HCoV) poznata pod nazivima HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 i HCoV-HKU1 uzrokovala su blage infekcije u imunokompetentnih ljudi (BAČENKOVA i sur., 2021.). Prirodni domaćini su im šišmiši i glodavci, a posrednici goveda i alpake. Osim u humanoj medicini koronavirusi su dugo poznati i u veterini (LORUSSO i sur., 2020.). Neki od njih inficiraju samo sisavce ili ptice dok postoje oni koji inficiraju i jedne i druge. Najčešće koronavirusne bolesti u veterini su transmisivni gastroenteritis svinja, zarazni peritonitis mačaka, zarazni bronhitis peradi te probavne i respiratorne infekcije u pasa (ZHANG i sur., 2020.; ZHOU i sur., 2021.). Koronaviruse čini jednolančana ribonukleinska kiselina (RNK) s visokom učestalošću rekombinacije kao najznačajnijim čimbenikom njihove raznolikosti. Stalni prijelaz virusa s izvornih domaćina na ljude i druge životinje uvelike je posljedica i pojačane ljudske aktivnosti, moderne poljoprivrede te urbanizacije (LORUSSO i sur., 2020.). Dobar dokaz je i pojava SARS-CoV-2 virusa. U kasnom prosincu 2019. nekoliko zdravstvenih ustanova u gradu Wuhanu, Hubei provinciji u Kini, prijavilo je pojavu pacijenata s pneumonijama nepoznatog uzroka (LORUSSO i sur., 2020.). Za većinu slučajeva mogla se napraviti poveznica sa Huanan živom tržnicom, najvećom tržnicom morske hrane gdje se životinje raznih vrsta prodaju žive ili mrtve na otvorenom (HOBBS i REID., 2020.; BARROSO-AREVALO i sur., 2021.). Među njima mogu se pronaći domaće životinje ali i razne vrste divljih npr. šišmiši, vidrice, zmije, razne vrste ptica itd. Krv i tjelesne tekućine tih životinja predstavljaju izvrsnu priliku novim virusima za prijelaz vrsnih barijera (LORUSSO i sur., 2020.). Prema retrospektivnom istraživanju pojava prvog poznatog slučaja zabilježena je 08. prosinca 2019. godine (HU i sur., 2021.). Bronhoalveolarnom lavažom dobiveni su uzorci iz kojih je izoliran i određen nukleotidni slijed genoma SARS-CoV-2, prvi puta javno objavljen

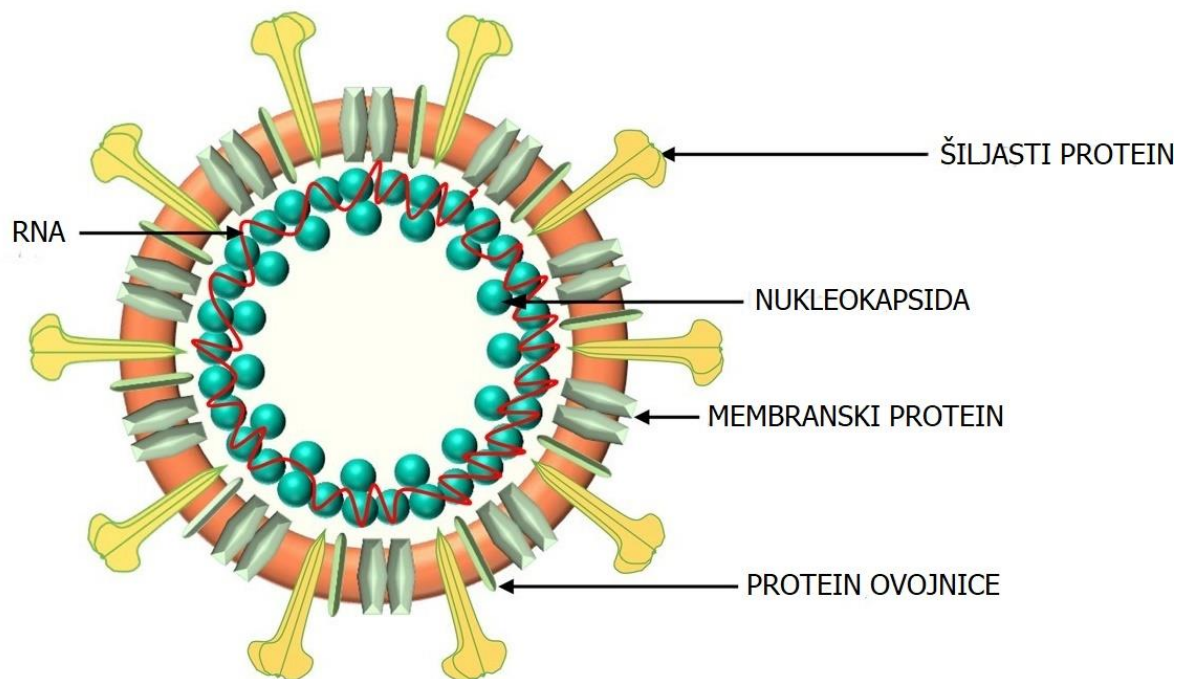
09. siječnja 2020. Kasnije se pojavilo još slučajeva u kojima se pacijenti nisu mogli povezati s tržnicom te pacijenata za koje se smatra da su inficirani u zdravstvenim ustanovama. Svi takvi slučajevi ukazivali su na prijenos virusa s čovjeka na čovjeka. 30. siječnja 2020. Svjetska zdravstvena organizacija proglasila je epidemiju javnozdravstveno hitnom situacijom od međunarodnog značaja. 11. veljače iste godine (ESAKANDARI i sur., 2020.; HU i sur., 2021.). Međunarodno vijeće za taksonomiju virusa (*engl. International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*) imenovalo je novi koronavirus „SARS-CoV-2“, a bolest je imenovala Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) „COVID-19“. Sredinom veljače Kina je dosegla epidemijski vrhunac prvog vala na što su vlasti odgovorile strogim epidemiološkim mjerama. Kao rezultat, broj dnevno oboljelih ljudi počeo je padati no unatoč tome međunarodno širenje ubrzano je krajem veljače. Visoka transmisivnost i veliki broj međunarodnih putovanja omogućili su širenje bolesti diljem Zemlje. Svjetska zdravstvena organizacija bila je primorana 11. ožujka 2020. označiti COVID-19 kao pandemiju (HU i sur., 2021.).

2.2. ETIOLOGIJA

2.2.1. GRAĐA VIRUSNE ČESTICE

Virusi porodice Coronaviridae jednolančani su RNK virusi s ovojnicom. Spadaju u jedne od najvećih RNK virusa sa veličinom viriona od 118 do 136 nm i veličinom genoma od 25 do 32 tisuće baznih parova (bp). Oblik viriona je najčešće okrugli s prepoznatljivim glikoproteinskim izdancima. Gledano elektronskim mikroskopom izdanci na površini viriona podsjećaju na Sunčevu koronu od kuda je i potekao naziv porodice *Coronaviridae* (DE GROOT i sur., 2011.; PAYNE, 2017.; BAČENKOVA i sur., 2021.). Unutar ovojnice virusa nalazi se fleksibilna nukleokapsida koju čine virusna RNK i nukleoprotein (*engl. nucleoprotein - N*). Svi koronavirusi imaju četiri strukturalna proteina. Tri od ta četiri su vezana za membranu: šiljasti (*engl. spike - S*), membranski (*engl. membrane - M*) i protein ovojnice (*engl. envelope - E*), te jedan je N protein (**Slika 1.**). Neki betakoronavirusi imaju dodatni membranski protein hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti (*engl. hemagglutinin-esterase - HE*) (PAYNE, 2017). SARS-CoV-2 ima četiri strukturalna i šesnaest nestrukturalnih proteina. Nestrukturalni proteini imaju veliku ulogu u umnažanju i transkripciji. S protein, koji se nalazi na površini viriona kao veliki izdanak, ima ulogu u ulasku viriona u stanicu. Čine ga dvije funkcionalne podjedinice nazvane S1 i S2 (KORATH i sur., 2021.). Podjedinica S1 ima ulogu u vezanju za receptor

stanice domaćina dok S2 spaja membranu viriona i membranu stanice domaćina. Podjedinica S1 često je drugačija kod različitih koronavirusa kako bi prepoznala razne receptore vezanja. SARS-CoV-2 šiljasti proteini slični onima SARS koronavirusu, te oba virusa kao mjesto ulaska prepoznaju receptor angiotenzin konvertirajućeg enzima 2 (*engl. Angiotensin Converting Enzyme 2 – ACE2*). Sastavni dio šiljastog proteina je područje vezanja receptora (*engl. Receptor Binding Domain- RBD*) koji prepoznaje ACE2 (WANG i sur., 2020.; KORATH i sur., 2021.).

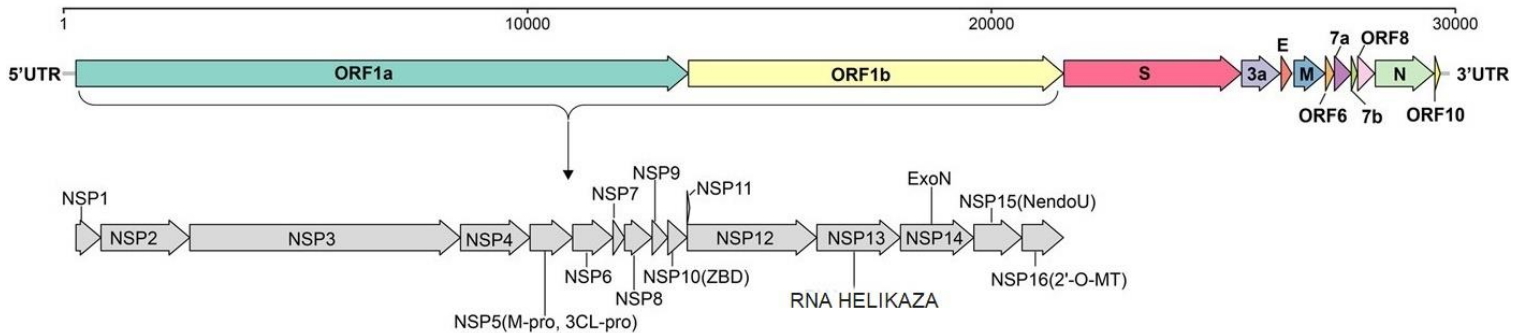


Slika 1. Građa virusne čestice. Prilagođeno iz ZHOU i sur., 2021.

2.2.2. GRAĐA GENOMA

Genom koronavirusa čini jednolančana pozitivno usmjerena ribonukleinska kiselina veličine 27 do 32 kbp, najveća od poznatih RNK virusa. Genom SARS-CoV-2 čine 29.9 kbp (WANG i sur, 2020.). Početak i kraj čine 5' i 3' neprevedena područja RNK (*engl. 5' i 3' Untranslated Region - 5', 3' UTR*). Između tih područja nalazi se sedam do deset otvorenih okvira za čitanje (*engl. Open Reading Frames - ORF*). Skoro dvije trećine genoma čini ORF1ab koji nosi upute za sintezu nestrukturalnih proteina (*engl. Nonstructural Protein - NSP*) NSP1- NSP16. Na njih

se redom nastavljaju S, E, M i N geni koji kodiraju istoimene strukturalne proteine (**Slika 2.**) (KHAILANY i sur., 2020.). Genom čine i cis-djelujući regulacijski elementi koji imaju veliku ulogu u regulaciji replikacije i transkripcije (PAYNE, 2017.).



Slika 2. Građa virusnog genoma. Prilagođeno iz ZHOU i sur., 2021.

2.3. TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA

Koronavirusi su velika grupa u redu *Nidovirales* pronađeni kod 45 vrsta životinja (ZHOU i sur., 2021.). Enzootski se mogu pronaći među prirodnim rezervoarima kao što su šišmiši, glodavci i ptice, iskazujući pritom visoku genetsku raznolikost (HU i sur., 2017.). Iako većina koronavirusa obitava u divljim životinjama, neki povremeno prijeđu vrsnu barijeru inficirajući ljude, perad i stoku. Na taj način izravno predstavljaju javnozdravstvenu i gospodarsku prijetnju (ZHOU i sur., 2021.). Početkom ovog stoljeća povećana je potreba za istraživanjem koronavirusa zbog pojave visokopatogenih i genetski različitih CoV-a koji su doveli do nekoliko epidemija. Razvojem novih tehnika izolacije virusa i analize njihova genoma otkriveni su mnogi novi virusi čime je značajno proširen red *Nidovirales*.

Red *Nidovirales* prvi je put predložen od strane ICTV 1996. godine. Korijen riječi čini latinski izraz za gnijezdo (*lat. nidum-* gnijezdo) (PRINGLE, 1996.). Red trenutno sadrži osam podredova među kojima je podred *Cornidovirineae* (WALKER i sur., 2019.). Među tih osam podredova podred *Cornidovirineae* sadrži najviše epidemijskih virusa (ZHOU i sur., 2021.). Unutar podreda nalazi se samo jedna porodica *Coronaviridae* koja se dalje dijeli u dvije

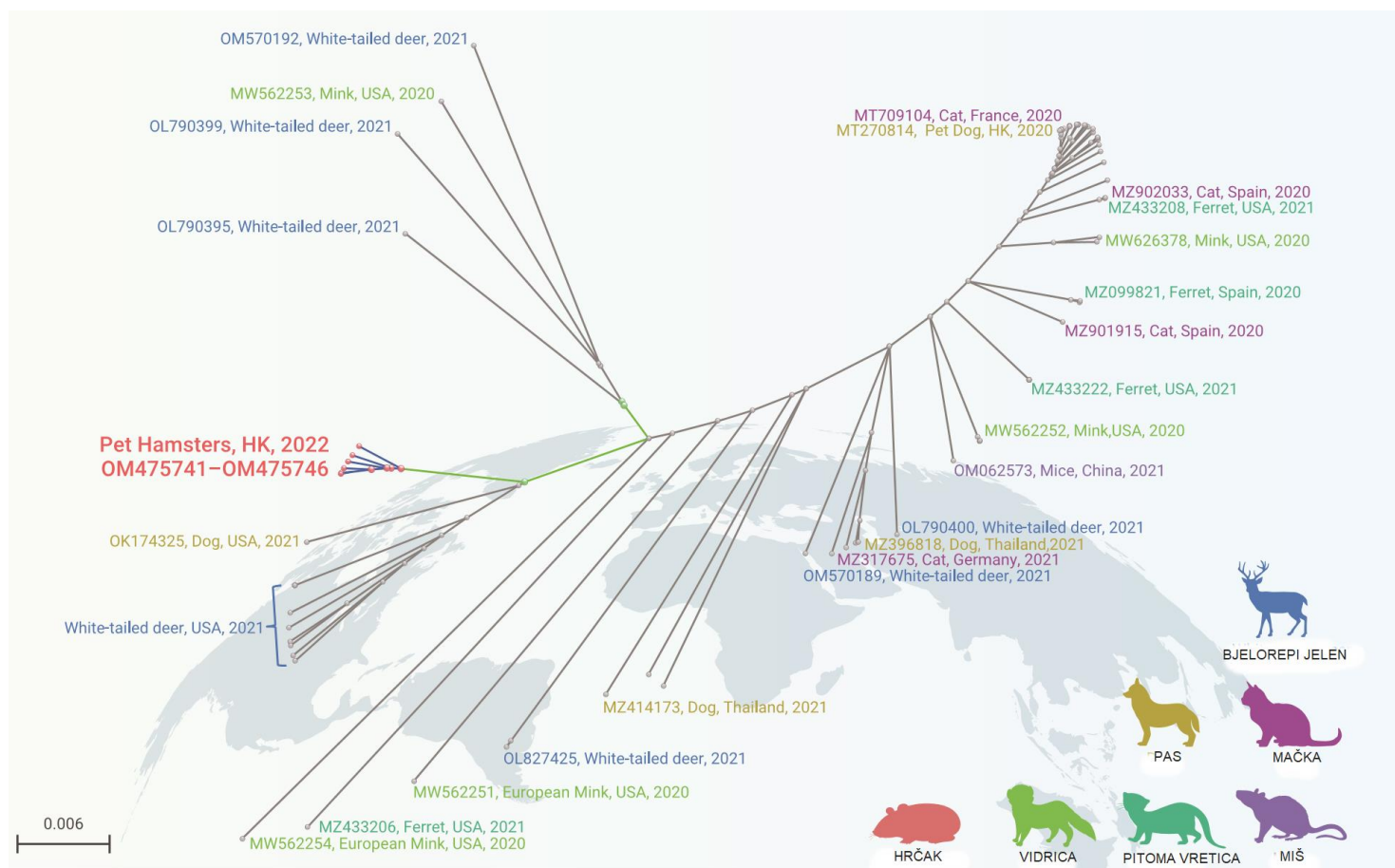
potporodice *Letovirinae* i *Orthocoronavirinae*. Potporodicu *Orthocoronavirinae* čine četiri roda *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* i *Gammacoronavirus* (MAVRODIEV i sur., 2020.; BAČENKOVA i sur., 2021.; ZHOU i sur., 2021.). Alfakoronavirusi i betakoronavirusi inficiraju sisavce, gamakoronavirusi i deltakoronavirusi uglavnom ptice te pojedini i sisavce (ZHOU i sur., 2021.).

Alfakoronavirusi su najveći rod. Od 19 pripadajućih vrsta jedanaest ih spada u koronavirus šišmiša. Ostali značajniji su virus transmisivnog gastroenteritisa, respiratorni koronavirus svinja, pseći koronavirus i koronavirus mačaka (DO i sur., 2021.). Još dva značajna su humani koronavirusi HCoV-229E i HCoV-NL63, najčešći respiratorni patogeni djece i starijih ljudi. Rod *Betacoronavirus* trenutno čini 14 vrsta. U njega spadaju najpatogeniji humani koronavirusi SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2 te veliki broj šišmišjih koronavirusa. Rod *Gammacoronavirus* čini pet vrsta koje uglavnom uzrokuju infekcije u ptica. Napoznatiji i gospodarski najvažniji je virus zaraznog bronhitisa peradi. Deltakoronaviruse čini sedam vrsta virusa koji uzrokuju infekcije ptica i sisavaca (ZHANG i sur., 2020.; ZHOU i sur., 2021.). U taksonomiji koronavirusa SARS-CoV, SARS-CoV-2, većina šišmišjih CoV-a, nekoliko CoV-a cibetki, ljuskavaca i drugih životinja klasificirani su u skupinu koronavirusa srodnih SARS (*engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Related- Coronavirus – SARSr-CoV*), podrod *Sarbecovirus*. Nedugo nakon pojave SARS-CoV-2 otkriven je šišmišji koronavirus RaTG13. Navedeni virus pokazao je veliku sličnost SARS-CoV-2 virusu (ZHOU i sur., 2021.). Uz navedeni šišmišji pronađen je virus u ljuskavaca s nešto nižim postotkom podudarnosti genoma (ZHOU i sur., 2021.). Iz navedenog je zaključeno da su prirodni rezervoar SARS-CoV-2 šišmiši dok se za ljuskavce smatra da su samo posredni domaćini (ZHANG i sur., 2020.). SARS-CoV-2 klasificiran je kao sedmi patogeni koronavirus ljudi (BAČENKOVA i sur., 2021.). Točna klasifikacija vrste SARS-CoV-2 glasi: carstvo *Riboviria*, kraljevstvo *Orthornavirae*, koljeno *Pisuviricota*, razred *Pisoniviricetes*, red *Nidovirales*, podred *Cornidovirineae*, porodica *Coronaviridae*, potporodica *Orthocoronavirinae*, rod *Betacoronavirus*, podrod *Sarbecovirus*.

2.4. TENACITET

Najvažniji čimbenici koji utječu na opstanak virusa su temperatura, vlaga, vrsta materijala ili podloge, radijacija/ izloženost svjetlu, protok zraka i dr. (ACHAK i sur., 2021.). Kontaminacija površina virusom SARS-CoV-2 može predstavljati rizik prijenosa infekcije prijemljivim domaćinima (DHAKAL i sur., 2021.; ISLAM i sur., 2022.b). Pri 20 °C i 50% relativne vlage zraka virus ostaje infektivan i do 28 dana na glatkim površinama kao što su metal, plastika, staklo, papir i novčanice. Na površinama s porama pr. pamučna odjeća, pri 20 °C virus ostaje infektivan pet do devet dana. Porastom temperature ubrzava se inaktivacija, pa je pri 40 °C virus infektivan maksimalno 24 sata (RIDDELL i sur., 2020.). Na 70 °C vrijeme inaktivacije iznosi pet minuta dok temperature hlađenja (4 °C) pogoduju njegovom dužem opstanku (CHI i sur., 2020.). Veličina kapljica utječe na vrijeme zadržavanja virusa. Manje kapljice se brže suše čime je inaktivacija isto brža (HOSSEINI i sur., 2021.). Slično kao i većinu virusa s ovojnicom, SARS-CoV-2 inaktivira pH <3. Proteinski sastav medija može produljiti infektivnost virusa. Dokazano je da visoko proteinska hrana, goveđi fetalni serum i sl. mediji produljuju aktivnost virusa. Tome vjerojatno doprinosi neutralni pH i vlažnost takvih medija. Od hrane najznačajniji su meso i morska hrana na kojima virus može opstati do 24 sata na +4 °C (DHAKAL i sur., 2021.). Pretragom bolničkih i gradskih otpadnih voda virus je pri 4 °C infektivan do 14 dana te do dva dana pri 20 °C (ACHAK i sur., 2021.). Unatoč dužem zadržavanju na glatkim površinama virus se brzo inaktivira tipičnim dezinficijensima pr. 70% etanolom, povidon jodom, kvarternim amonijevim spojevima i sl. Za dezinfekciju zraka mogu se koristiti para vodikova peroksida, ozon i UV spektar zračenja (MARQUES I DOMINGO, 2021.). UV-C zrake imaju najkraću valnu duljinu i time najvišu energiju što ih čini upotrebljivima za virusnu sterilizaciju i dezinfekciju zraka i površina. Sunčeva svjetlost koja dopire do površine zemlje sadrži UV-B zrake koje su manje efikasne od UV-C zraka. Površine se tim načinom mogu inaktivirati kroz sat vremena pri UV indexu 10 (FERNANDEZ-RAGA i sur., 2021.). Inaktivacija na koži puno je brža od one na metalu i drugim površinama, otprilike 9 sati. Pri tretmanu kože 80%-tnim etanolom do inaktivacije dolazi za 15 sekundi (HIROSE i sur., 2020.). Najbolja inaktivacija postiže se kombinacijom fizikalnih i kemijskih metoda (ACHAK i sur., 2021.).

2.5. PROŠIRENOST



Slika 3. Globalna proširenost SARS-CoV-2. Prilagođeno iz ZHU i sur., 2022.

Prvi veći val na sjevernoj polutki dogodio se u zimu 2020. u zemljama kao što su Kina, Japan, Sjedinjene Američke Države (SAD) i zemlje Europe (PARRA-LUCARES i sur., 2022.). COVID-19 u ljudskoj je populaciji ubrzo prerastao u pandemiju, te je već u lipnju 2020. pozitivne slučajeve prijavilo 216 zemalja diljem svijeta (SONG i sur., 2020.; YANG i sur., 2020.). Značajni utjecaj na širenje imaju geografski i okolišni uvjeti, zdravstveni sustav pojedine države te uspostavljanje i provođenje naredenih mjera. Zapadne europske zemlje, Japan i Kanada imaju veći postotak procjepljenosti, otprilike 70%, dok je u Indiji, Južnoj Africi i Južnoj Americi procjepljenost ispod 50%. Neravnomjernost procjepljenosti povezuje se sa socioekonomskim statusom zemalja i otvara mogućnost nastanka novih varijanti u siromašnijim područjima (PARRA-LUCARES i sur., 2022.). Kako pandemija napreduje otkrivene su desetine tisuća novih mutacija koje eventualno vode novim varijantama (CYRUS MAHER i sur., 2022.). Prvi slučajevi u Europi otkriveni su u Francuskoj 24. siječnja 2020. te Njemačkoj 28. siječnja 2020. Utvrđeno je da je virus u Francusku, Njemačku i Italiju uveden

iz kineske pokrajine Hubei. Smatra se da se po Europi kasnije najviše proširio iz Italije (NADEAU i sur., 2020.). Od 31. prosinca 2021. prihvaćene su sljedeće varijante virusa: C.37 (Lambda) i B.1.621 (Mu) kao varijante od interesa (*engl. Variant Of Interest - VOI*); B.1.1.7 (Alfa), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta) i B.1.1.529/BA.1 (Omikron) kao zabrinjavajuće varijante (*engl. Variant Of Concern - VOC*) (PARRA-LUCARES i sur., 2022.). Alfa varijanta pojavila se u rujnu 2020. u Ujedinjenom Kraljevstvu, Beta negdje u isto vrijeme u Južnoj Africi a Gamma u studenom 2020. u Brazilu. U skorije vrijeme Delta i Omikron odgovorni su za značajan porast broja slučajeva, dok su Alfa, Beta i Gamma značajno rijede. Delta se pojavila u Indiji u listopadu 2020. i postala globalno dominantna u prosincu 2021. godine. (PARRA-LUCARES i sur., 2022.) Omikron se pojavio u studenom 2021. u Južnoj Africi prvi puta kod putnika iz Bocvane. Ubrzo se značajno proširio u svijetu i preuzeo ulogu globalno dominantne varijante. Zatim su iz njega proizašle podlinije. BA.1, BA.2 i BA.3 otkrivene su skoro istovremeno dok su kasnije dokazane još BA.4 i BA.5, te još podlinija unutar BA.1 i BA.2. U početku je dominirala podlinija BA.1 no BA.2 polako preuzima vodeće mjesto u svjetskoj raširenosti. U međuvremenu je došlo do rekombinacije između Delte i Omikrona pa su nastale podlinije XD (Francuska, Danska), XF (Ujedinjeno Kraljevstvo) i XS (SAD) često nazivane i Deltakron (SHRESTHA i sur., 2022.).

Prvi slučaj zaraze u Hrvatskoj prijavljen je 25. veljače 2020. Tijekom ljeta broj slučajeva postupno je rastao da bi u rujnu došlo do naglog porasta oboljelih (VILIBIC-CAVLEK i sur., 2021.a). Već u veljači 2021. prijavljen je treći val zaraze kojim je dominirala Alfa (B.1.1.7) varijanta, dok je pojava Delte (B.1.617.2) u lipnju iste godine najavila četvrti val. Beta i Gamma u tom trenutku postale su sporadične jer je u roku od dva mjeseca Delta dijagnosticirana u 98 % slučajeva. U studenom 2021. pojava Omikrona najavila je peti val, kojim je on dominirao do te mjere da je u par tjedana Delta pala na manje od 15 % prijavljivanih slučajeva (FERENČAK i sur., 2022.).

Do 30. studenog 2022. OIE-u je prijavljeno 695 slučajeva infekcije kod životinja. Slučajevi su prijavljivani globalno u 36 zemalja kod 26 životinjskih vrsta (**Slika 3.**). Neke od navedenih su mačke, psi, vidrice, kune, pitome vretice, divlji felidi, jeleni, hrčci itd. U Hrvatskoj najviše slučajeva prijavljeno je kod mačaka, pasa, lavova i riseva. Sedamnaestogodišnji pomeranac iz Hong Konga prvi je kućni ljubimac pozitivan na SARS-CoV-2, 26. veljače 2020. (HOBBS i REID, 2022.). Od ljubimaca najviše su prijavljivane mačke: četiri u SAD-u, dvije u Francuskoj i po jedna u Hong Kongu, Belgiji, Španjolskoj, Njemačkoj i Rusiji do srpnja 2020. U ožujku i travnju 2020. pet tigrova i tri lava proglašena su pozitivnima u zoološkom vrtu u New Yorku (BARROSO-AREVALO i sur., 2021.; HOBBS i REID, 2022.). Do kraja lipnja 2020. 17 farmi vidrica u Nizozemskoj i dvije u Danskoj prijavljuju infekciju virusom. Bjelorepi jeleni na području Sjeverne Amerike visoko su prijemljivi na SARS-CoV-2 i uspijevaju održati njegov prijenos u divljini. Više od 30 % testiranih jelena u Ohioju imalo je pozitivan nalaz lančanom reakcijom polimeraze (*engl. Polymerase Chain Reaction - PCR*). Sličnoj proporciji jelena u

drugim dijelovima SAD-a dokazana je serokonverzija (BIENZLE i sur., 2022.; MURPHY I LY, 2022.). Zadnji ozbiljniji slučaj infekcije u životinja zabilježen je 15. siječnja 2022. u Hong Kongu gdje su sirijski hrčci uvezeni iz Nizozemske unijeli novu Delta varijantu (AY.127) među tamošnju populaciju ljudi (LING-YEN i sur., 2022.; WOO-CHAN i sur., 2022.).

2.6. EPIZOOTIOLOGIJA

Prvim prirodnim domaćinom SARS-CoV-2 smatra se vrsta *Rhinolophus affinis*, vrsta šišmiša iz porodice *Rhinolophidae*. Za razvoj pandemije u ljudi zbog zoonotskog učinka pretpostavlja se da postoji barem jedan posredan domaćin. U početku jedini dokazani primjer bio je petoprsti ljuskavac, *Manis pentadactyla* (BAČENKOVA i sur., 2021.). Obzirom da divlje i domaće životinje mogu biti posredni domaćini, potrebno je tijekom pandemije pretraživati životinje kako bi se izbjegao prijenos čovjek-životinja-čovjek (KANG i sur., 2021). Prirodni prijenosi sa ljudi na životinje dokazani su kod kućnih ljubimaca, životinja u zoološkim vrtovima, te farmskih i divljih životinja. Vrste sa najvećim rizikom infekcije su primati i većina mesojeda (HOBBS I REID, 2022.). Nekoliko slučajeva dokazuje kako SARS-CoV-2 može lako preći s ljudi na životinje, no većina takvih prijenosa ne završi zadržavanjem virusa. Održavanje virusa i daljnja evolucija virusnog genoma primjećeni su jedino kod epizootija na farmama vidrica i među divljim bjelorepim jelenima (BIENZLE i sur., 2022.; LING-YEN i sur., 2022.). Prijenos sa životinja na ljude dokazan je na farmama krznaša u Nizozemskoj gdje je virus prešao s vidrica na radnike, mačke i pse u okolici farmi (BIENZLE i sur., 2022.; LING-YEN i sur., 2022.; MURPHY I LY, 2022.). Obrnuta zoonoza zabilježena je još samo kod sirijskih hrčaka u Hong Kongu (LING-YEN i sur., 2022.; MURPHY I LY, 2022.; WOO-CHAN i sur., 2022.). Među domaćim životinjama, mačke i psi su prijemljive vrste s blagim i prolaznim izlučivanjem virusa. Virus cirkulira među njima ali u količini nedovoljnoj da služe kao rezervoar za ljude (BESSIERE i sur., 2022.). Pas i mačka u Teksasu pretraženi su PCR-om dva dana nakon pozitivnog nalaza njihova vlasnika. Uzeti su brisevi nosa, ždrijela i krzna te su svi bili pozitivni na SARS-CoV-2 B.1.1.7 varijantu. Vlasnik prethodno opisuje kako je kontakt sa ljubimcima dosta blizak te uključuje spavanje u istoj sobi i krevetu (HAMER i sur., 2022.). Mačke su prijemljivije na infekciju u odnosu na pse (HOBBS I REID, 2022.). Istraživanje u Wuhanu pokazuje da mačke i psi iz COVID-19 pozitivnih kućanstava imaju najviše titrove neutralizirajućih protutijela. Znači da je najveći izvor infekcije za njih sam vlasnik. Mačke iz COVID-19 negativnih kućanstava, ali s mogućnošću izlaženja van, isto serokonvertiraju što upućuje na učinkovit prijenos s mačke na mačku (BARROSO i sur., 2022.). Još jedan dobar primjer je i seroprevalencija u skloništima koja primjerice u Nizozemskoj iznosi 2,1% (BARROSO i sur., 2022.). Eksperimentalno inficirane mačke izlučuju virus nazofaringealno 10 dana, orofaringealno 7 dana i rektalno 14 dana ali takvi uvjeti daleko su od tipičnih uvjeta u domaćinstvu (BIENZLE i sur., 2022.). Prijenos virusa je uglavnom direktnim kontaktom ali i

kapljično (BARROSO-AREVALO i sur., 2021.; HOBBS i REID, 2022.). Za razliku od mačaka, psi mogu biti inficirani ali ne prenose virus na druge pse. Klinički znakovi u pasa su rijetki te oni virus ne izlučuju ni u eksperimentalnim uvjetima. Virus nije dokazan orofaringealno niti u organima pri razudbi (HOBBS i REID, 2022.). Većina pozitivnih pasa ima pozitivan rektalni uzorak kao rezultat bliskog kontakta s inficiranim vlasnicima (BEDDIAF i sur., 2022.; HOBBS i REID, 2022.). Psi u skloništima manje su podložni infekciji od pasa iz pozitivnih kućanstava (BARROSO i sur., 2022.). Iako većina infekcija u pasa i mačaka potječe od ljudi, čimbenici rizika prijenosa sa vlasnika na ljubimce nisu dobro definirani. Ljubimci najčešće imaju dosta blizak kontakt sa vlasnicima zbog čega su više nego dovoljno izloženi SARS-CoV-2. Rizik se povećava kod određenih oblika ponašanja kao što su ljubljenje ljubimaca i spavanje na istom krevetu (BIENZLE i sur., 2022.). Upitna je i mogućnost kontaminacije okoliša od strane ljubimaca, osobito zatvorenih prostora, jer i to predstavlja jedan od načina širenja virusa (KANG i sur., 2021.). Obzirom da nije dokazan prijenos na ljude niti značajan na druge životinje, zasad na pse i mačke gledamo kao „dead-end“ domaćine (KORATH i sur., 2021.). Neovisno o tome, cirkulacija bi se trebala nadgledati zbog velike mogućnosti nastanka novih varijanti u životinja (BESSIERE i sur., 2022.).

2.7. PATOGENEZA

Psi su slabo prijemljivi na SARS-CoV-2 iz dva vjerojatna razloga. Količina stanica sa izloženim ACE2 i serin 2 transmembranska proteaza (*engl. Transmembrane Protease Serin 2 – TMPRSS2*) receptorima znatno je manja u respiratornom sustavu, a sami ACE2 receptori imaju izmjene značajnih aminokiselina koje onemogućavaju adsorpciju virusa (HOBBS I REID, 2022.). Mačke su, u usporedbi s psima, prijemljivije na infekciju SARS-CoV-2 virusom (BEDDIAF i sur., 2022.). Virus se kod mačaka umnaža u gornjem respiratornom traktu nakon prijenosa putem zraka. Kod njih je dokazana velika količina stanica s ACE2 i TMPRSS2 receptorima. Takve stanice, koje su mete SARS-CoV-2 virusa za adsorpciju, rasprostranjene su po organima probavnog, respiratornog i mokraćnog sustava. Na temelju tih saznanja pretpostavlja se da infekcija u mačaka ima više ulaznih vrata (HOBBS I REID, 2022.). U eksperimentalno inficiranih mačaka najzamjetnija je limfoplazmoticna infiltracija gornjih respiratornih puteva. Serokonverzija je kod pojedinih pasa i mačaka primjetna već sedmi dan, kod ostalih četrnaesti dan od infekcije. IgM protutijela dokazana su sedam do 14 dana nakon infekcije ali ne i 28. dan. IgG protutijela dokazana su isto nakon sedam do 14 dana ali u nešto nižoj količini kod pasa u odnosu na mačke (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.).

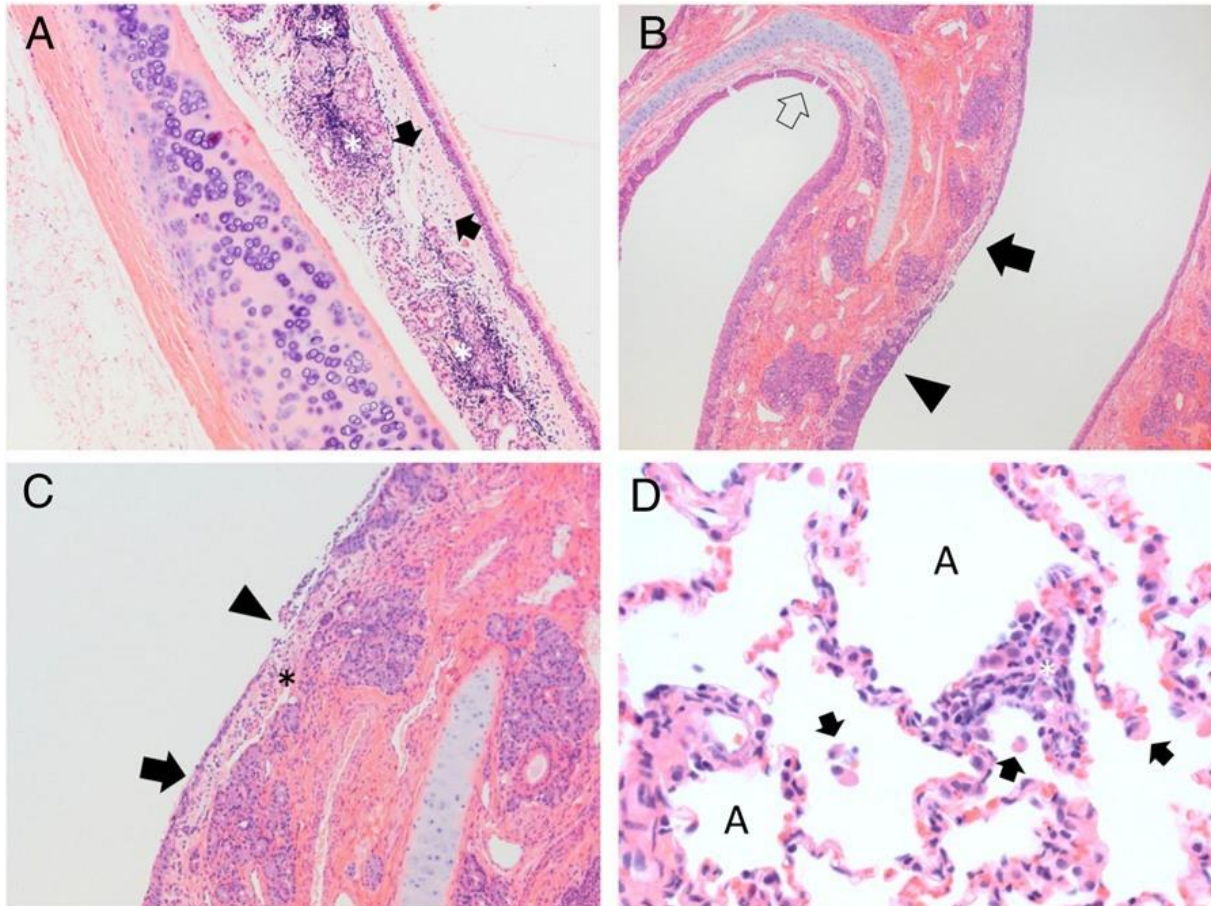
2.8. KLINIČKA SLIKA

Istraživanja pokazuju da je većina kućnih ljubimaca inficirana samo prolazno. Infekcije su uglavnom supkliničke ili povezane s prolaznim respiratornim i gastrointestinalnim kliničkim znakovima (BASSIERE i sur., 2022.; BIENZLE i sur., 2022.). Prvi prijavljeni slučaj u Europi je mačka iz Belgije. Klinički znakovi bili su kompatibilni s koronavirusnom infekcijom te je životinja nakon PCR testiranja ispostavljenog sadržaja i fecesa proglašena pozitivnom na SARS-CoV-2. Devet dana nakon nastupa kliničkih znakova stanje joj se poboljšalo (HOSIE i sur., 2021). Za mačke je dokazano da razvijaju i supklinički i simptomatski oblik pri čemu su mlađe životinje podložnije težim oblicima i uginuću (HOBBS i REID, 2022.). Sistemskim pregledom prirodnih slučajeva utvrđeno je da su mačke u prošlosti razvijale razne blage do ozbiljne respiratorne simptome. Od navedenih simptoma dominiraju kihanje i kašalj, gastroenteritisi (povraćanje i proljev), opći infektivni sindrom (vrućica, letargija, inapetencija), kardiovaskularni i neurološki znakovi (BARROSO i sur., 2022.; MASTUTIK i sur., 2022.). Neka istraživanja pokazuju da kliničke znakove treba tumačiti sa zadržkom jer se usprkos pozitivnom PCR nalazu većina simptoma može povezati s ostalim komorbiditetima (BARROSO-AREVALO i sur., 2021.). Iako su psi podložni infekciji, razvoj kliničkog oblika bolesti jako je rijedak u odnosu na mačke (BARROSO i sur., 2022.; BEDDIAF i sur., 2022.; KORATH i sur., 2021.). Uglavnom ostaju zdravi, a ako se znakovi primijete češće su uzrokovani nepovezanim bolestima (KORATH i sur., 2021.). Unatoč slaboj prijemljivosti ne treba zaboraviti da je pandemija negativno utjecala na životinje indirektno. Zbog provođenja naređenih mjera u ljudskoj populaciji zabilježena je smanjena potražnja za veterinarskim uslugama. Osim mjera, strah među ljudima doveo je do povećanog napuštanja pasa i mačaka te su zabilježeni slučajevi bacanja životinja sa nebodera (HOBBS I REID., 2022.).

2.9. PATOANATOMSKI I PATOHISTOLOŠKI NALAZ

Većina promjena opisana je kod mačaka nakon pokusnog izazivanja infekcije. Patoanatomski makroskopske promjene nisu primijećene. Histopatološke promjene kod mačaka ukazuju da inače zdrave mačke mogu razviti blagi supklinički oblik s blagim patološkim promjenama gornjih respiratornih puteva (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.; MASTUTIK i sur., 2022.). Čest je nalaz hiperplazije epitela nosne sluznice s umjerenom infiltracijom mononukleara u lamini propriji (BARROSO-AREVALO i sur., 2022.a). Neke mačke razvijaju minimalni limfoplazmocitni rinitis i traheitis (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.). Kod infekcije mačića starosti deset do 14 tjedana primijećene su određene promjene na plućima što dokazuje da se virus lakše umnaža u mlađih životinja (CLEARY i sur., 2020.; HOSIE i sur., 2021.; MASTUTIK i sur., 2022.). Histologija pluća tih životinja pokazuje izražen plućni edem, blagu limfocitnu intersticijsku pneumoniju s peribronhalnim i perivaskularnim limfocitnim

nakupinama i alveolarnom histiocitozom (**Slika 4.**) (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.; BARROSO-AREVALO i sur., 2022.a). Na tankom crijevu izražen je edem mukoze s blagim povećanjem Peyerovih ploča. Unatoč nalazu patoloških promjena, molekularnim testiranjem tkiva *post mortem* virusna RNK nije detektirana. Posljedično se može zaključiti da su patološke lezije posljedica imunosnog odgovora organizma na prisustvo antigena. Više studija trebalo bi provesti kako bi se izvukli točniji zaključci (BARROSO-AREVALO i sur., 2022.a).



Slika 4. Patohistološki nalaz. A) Histološki prikaz dušnika 5. dan infekcije. Submukoza je proširena zbog izraženog edema (strelice) sa obiljem limfocitnog infiltrata (zvjezdice). Hematoksilin-eozin bojanje, povećanje 100x.; B) Histološki prikaz nosnih turbinata 5. dan infekcije. Usporedba mukoze normalne debljine (prazna strelica) sa hiperplastičnim (glava strelice) i ulceriranim (crna strelica) epitelom. Submukoza je u području ulceracija edematozna te infiltrirana neutrofilima i mononuklearima. Hematoksilin-eozin bojanje, povećanje 40x.; C) Histološki prikaz nosnih turbinata 5. dan infekcije. Respiratorni epitel rangira od oslabljenog (strelica) do ulceriranog (glava strelice) sa preostalim površinskim staničnim debrijem. Submukoza (zvjezdica) je u području ulceracija edematozna te infiltrirana neutrofilima i mononuklearima. Hematoksilin-eozin bojanje, povećanje 100x.; D) Histološki prikaz plućnog

parenhima 42 dana nakon infekcije. Alveolarni prostori („A“) ispunjeni su mononuklearima (strelice). Alveolarni zid ispunjen je mononuklearima i mjestimičnim neutrofilima (zvjezdica). Hematoksilin-eozin bojanje, povećanje 400x. Prilagođeno iz BOSCO-LAUTH i sur., 2020.

2.10. DIJAGNOSTIKA

Iako je dijagnostika fokusirana na ljude, razne molekularne i serološke metode prilagođavaju se dijagnostici virusa u životinja (BARROSO i sur., 2022.). Trenutno se životinje preporuča testirati samo nakon konzultacije sa veterinarskom službom jer su preporuke različite za različite zemlje. U nekoliko Europskih zemalja testiranje je omogućeno u veterinarskim laboratorijima. Molekularna metoda dijagnostike je RT-PCR za otkrivanje virusne RNK iz briseva nosa, ždrijela i rektuma. Serološke metode za dokaz protutijela u serumu podrazumijevaju imunoenzimski test (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*) i virus neutralizacijski test (VN test) (HOSIE i sur., 2021.). Serokonverzija u ljubimaca slična je serokonverziji u ljudi. Psi i mačke razvijaju protutijela nakon 14 dana od dana infekcije. Iz toga razloga serološka testiranja trebalo bi provoditi barem dva tjedna nakon kontakta sa COVID-19 pozitivnim vlasnicima (BARROSO i sur., 2022.). Posebnu pažnju trebalo bi posvetiti imunoenzimskom testu zbog daljnje evaluacije specifičnosti i osjetljivosti te mogućih unakrižnih reakcija. Izolacija virusa iz briseva dozvoljena je samo u laboratorijima biosigurnosne razine tri zbog potencijalnog rizika infekcije laboratorijskog osoblja (HOSIE i sur., 2021.).

2.11. LIJEČENJE

Do danas nema dokazano učinkovitih lijekova službeno namijenjenih za SARS-CoV-2 infekciju u životinja (HU i sur., 2021.). Po uzoru na humanu medicinu neki od lijekova korišteni su i u veterinarskoj. Primjer su inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima i blokatori angiotenzinskih receptora (KORATH i sur., 2021.). Iako zasad nema točnih podataka kako ti lijekovi mogu utjecati na ishod infekcije u veterini, sve češće se spominju u liječenju COVID-19 bolesti kod ljudi (HU i sur., 2021.). Obzirom da SARS-CoV-2 može potaknuti jak imunski odgovor, potencijalna potporna terapija može uključivati imunomodulatore. Deksametazon je kortikosteroid sa protuupalnim i imunosupresivnim djelovanjem čiji je glavni učinak inhibicija upalnih citokina i neutrofilne infiltracije (HU i sur., 2021.). Američka agencija za hranu i lijekove odobrila je korištenje antivirusnih lijekova Remdesivir i Paxlovid u liječenju ljudi, a još nekoliko njih se istražuje pr. Molnupiravir (SINGH i sur., 2022.). Iako postoje protuvirusni lijekovi učinkoviti protiv mačjih koronavirusa (*engl. Feline Coronavirus - FCoV*), upitno je koliko ih može djelovati na SARS-CoV-2. GC376 je antivirusni lijek uspješno korišten u

liječenju zaraznog peritonitisa mačaka (*engl. feline infectious peritonitis - FIP*). On i njegov metabolit GC373 pokazali su se kao učinkoviti inhibitori SARS-CoV-2 u *in vitro* istraživanjima (VUONG i sur., 2020.). Nema objavljenih istraživanja koja dokazuju njihovu *in vivo* učinkovitost protiv SARS-CoV-2 (IZES i sur., 2020.). Za Molnupiravir, potencijalni lijek za ljude, primjećeno je smanjenje količine virusa u plućnom tkivu kod sirijskih hrčaka i smanjenje prijenosa među pitomim vreticama (POURKARIM i sur., 2021.). Remdesivir (GS-5734) je antivirusni lijek sa širokim spektrom djelovanja, uključujući koronavirus. U veterinarskoj medicini već se eksperimentalno ali uspješno koristi njegov metabolit GS-441524 u liječenju FIP-a (ROY i sur., 2022.). Terapijski učinak Remdesivira na rezus makakijima očitovao se smanjenjem plućnih infiltracija i općenito smanjenjem patoloških promjena na plućima uzrokovanih SARS-CoV-2 virusom (PAGLIANO i sur., 2021.).

Iako je pandemija imala manje neposredne učinke na zdravlje životinja, neosporan je značaj novih podataka koje dobivamo praćenjem uspjeha liječenja SARS-CoV-2 u čovjeka. Fokus znanstvene javnosti na ovu problematiku može rezultirati spoznajama koje će u konačnici biti primjenjive u liječenju koronavirusnih infekcija neovisno o vrsti virusa ili domaćina, što je upravo u osnovi One Health pristupa (IZES i sur., 2020.).

2.12. IMUNOPROFILAKSA

Iako potreba da se domaće životinje cijepi u ovom trenutku može izgledati kao iracionalni pothvat u široj javnosti, uspješna eliminacija SARS-CoV-2 ostvariva je samo nakon uspješne kontrole prijenosa u svih prijemljivih vrsta (SHARUN i sur., 2021.). U mnogim zemljama već je prepoznata potreba za cijepljenjem divljih životinja držanih u zatočeništvu, koliko zbog zaštite zaposlenika toliko i zbog njihova očuvanja. Među prvim cijepljenim životinjama razne su vrste primata, divljih felida i vidrica (SHARUN i sur., 2021.). Varijante proizašle s uzgojnih farmi vidrica odgovorne su za 40% COVID-19 slučajeva u Nizozemskoj. Takvi događaji samo potvrđuju stalno prisutan rizik od preskakanja međuvrsne barijere, zoonotskog i potencijalnog zooantroponotskog prijenosa. Dok su za ljude stvorena mnoga SARS-CoV-2 cjepiva, malo ih se stvara za ljubimce i životinje općenito. Cijepljenje je učinkovit način prevencije mnogih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Istraživanje životinjskih koronavirusa dovelo je do razvoja nekoliko učinkovitih veterinarskih cjepiva i pomaže usmjeravanju razvoja sigurnog i učinkovitog cjepiva za SARS-CoV-2 (SHARUN i sur., 2021.; TABYNOV i sur., 2022.). U veterinarskoj medicini samo su dva SARS-CoV-2 cjepiva prijavljena (TABYNOV i sur., 2022.). Rusija je registrirala prvo svjetsko SARS-CoV-2 cjepivo za životinje, Carnivac-Cov, inaktivirano cjepivo. Klinički je testirano u pasa, mačaka, vidrica i lisica nakon čega je odobrena masovna proizvodnja. Imunost potaknuta njime traje minimalno šest mjeseci

(SHARUN i sur., 2021.; TABYNOV i sur., 2022.). Drugo cjepivo je Zoetis rekombinantno cjepivo koje se koristi u zoološkim vrtovima SAD-a. LinearDNA™ COVID-19 cjepivo za upotrebu kod mačaka trenutno je u razvoju zajedničkom suradnjom SAD-a i Italije. Preliminarna istraživanja pokazuju kako jedna doza uspješno potiče tvorbu visokog titra protutijela (SHARUN i sur., 2021.). U 2022. objavljeno je nekoliko radova iz Španjolske, Republike Koreje i Kazahstana u kojima se opisuje stvaranje cjepiva za upotrebu u mačaka i pasa u svrhu sprječavanja pojave reverzne zoonoze (BARROSO-AREVALO i sur., 2022.b; GA i sur., 2022.; TABYNOV i sur., 2022.). Preventivne mjere kao izbjegavanje bliskog kontakta pozitivne osobe i ljubimca mogu biti efikasna prva linija obrane. Dodatne mjere možda su potrebne kod životinja izloženih visokom titru virusa ili kod ljudi podložnih teškom obliku bolesti, a koji su u čestom kontaktu sa prijemljivim životinjama (BARROSO-AREVALO i sur., 2022.b).

2.13. JAVNO ZDRAVSTVO

Kako pandemija ulazi u treću godinu sve je vjerojatnije da će u jednom trenu biti proglašena endemijom (ZHU i sur., 2022.). Iako je neka bolest endemska ne znači da je manje zabrinjavajuća i opasna. Još od samog početka 2019. SARS-CoV-2 mutira i evoluirao često završavajući novim varijantama. Rast genetske raznolikosti i velik broj slučajeva stvara savršene uvjete za rekombinaciju virusa i stvaranje novih značajnih varijanti (SINGH i YI, 2021.). Zadnja takva varijanta je Omikron za koju je dokazano da se lakše prenosi i izbjegava imunosni odgovor. Nove varijante predstavljaju značajan problem za javno zdravstvo (ZHU i sur., 2022.). Veterinari djeluju u veterinarskom javnom zdravstvu koje ima ogromnu ulogu u zaštiti i održavanju zdravlja ljudi (LORUSSO i sur., 2020.). „One Health“, naziv je koncepta koji nalaže da je zdravlje ljudi, životinja i okoliša međusobno prepleteno i ovisno (ISLAM i sur., 2022.a). Zadnjih godina primjećena je ključna uloga veterinaru u proučavanju postanka, evolucije i patogeneze koronavirusa. Poznato je da koronavirusi već desetljećima uzrokuju bolesti farmskih životinja i kućnih ljubimaca (LORUSSO i sur., 2020.). SARS-CoV-2 pokazao se kao još jedan takav virus. U nedavnom istraživanju prijavljen je zoonotski prijenos SARS-CoV-2 sa ljubimaca na ljude. Hrčci uvezeni iz Nizozemske izazvali su širenje bolesti među ljudskom populacijom u Hong Kongu (WOO-CHAN i sur., 2022.). Slični slučajevi otkrivaju nedostatke u razumijevanju trenutne pandemije te propuste kontrole i nadzora. Kontinuirana evolucija virusa primjećena je u vidrica na farmama krzna i bjelorepih jelena u divljini (MURPHY i LY, 2022.). Prijavljeni slučajevi mogu biti samo vrh ledenjaka jer neotkrivene cirkulacije među drugim divljim životinjama predstavljaju veliku vjerojatnost. SARS-CoV-2 mogao bi opstajati i cirkulirati u životinjama koje bi postale rezervoar i izvor zaraze za ljude (HU i sur., 2021.; ZHU i sur., 2022.). Ako se uzme u obzir da često dolazi do rekombinacije, ista se može dogoditi sa široko prisutnim životinjski koronavirusima (SINGH i YI, 2021.; ZHU

i sur., 2022.). Unatoč navedenim mogućnostima malo truda ulaže se u monitoring takvih događaja u životinjskoj populaciji. „Bolest X“, pseudonim je koji služi kao podsjetnik da je naopasnija bolest vjerojatno ona koja još nije otkrivena. U jednom trenu to je bila COVID-19 i iako pandemija još nije pod kontrolom već bi trebalo razmišljati o mogućnosti pojave nove (ISLAM i sur., 2022.a). Pandemija može biti proglašena gotovom u skorijoj budućnosti no za javno zdravstvo ostaju još mnoga neriješena pitanja. Sistemske nadzore SARS-CoV-2 u ljubimaca, divljih i domaćih životinja od presudnog je značaja u potražnji tih odgovora (ZHU i sur., 2022.). Svijet će se eventualno oporaviti od COVID-19, a ako nas je bolest išem naučila to je da princip jednog zdravlja treba primjenjivati odmah za zdraviju budućnost svih vrsta (ISLAM i sur., 2022.a).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ODABIR UZORAKA

Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci seruma iz opće populacije pasa i mačaka prikupljeni u razdoblju od siječnja do travnja 2022. godine. Vremensko razdoblje odabrano je praćenjem prevalencije u ljudi očekujući da će ona korelirati sa prevalencijom u životinja. Za potrebe istraživanja prikupljeni su ostatni uzorci seruma sa klinika Sveučilišne veterinarske bolnice Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Serumi su uzimani u svrhu provjere zdravstvenog stanja životinja. Za vrijeme prikupljanja pohranjeni su na -20 °C u Virološkom laboratoriju Veterinarskog fakulteta. Kod odabira seruma jedini preduvjet bio je da životinje imaju dostupne anamnestičke i podatke nacionala u medicinskom zapisniku. Ukupno je pretraženo 296 seruma pasa i 140 seruma mačaka.

3.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA

Za potrebe statističke obrade preuzeti su podaci o nacionalu te anamnezi i kliničkoj slici iz medicinskih zapisnika zaprimljenih životinja. Oni uključuju vrstu, pasminu, spol, dob, prebivalište, trenutnu dijagnozu, prisutnost respiratornih kliničkih znakova, nalaz rendgenske pretrage i pripadnost azilima.

Uzorkovanje i prikupljanje podataka odobreno je od strane Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 6. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća u akademskoj godini 2020/21. (klasa: 640-01/21-17/14; ur. br.: 251-61-41-21-01).

3.3. DOKAZ PRISUTNOSTI PROTUTIJELA ZA SARS-COV-2

Za dokazivanje protutijela na SARS-CoV-2 u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korišten je virus neutralizacijski test (VN test).

Virus neutralizacijski test serološka je metoda dijagnostike koja se koristi za određivanje titra neutralizacijskih protutijela u uzorku seruma. Reakcija neutralizacije odvija se u jažicama mikrotitracijskih plitica, u kojima se serijska razrijeđenja seruma, inkubiraju s unaprijed određenom dozom virusa i stanicama. Dokazom prisutnosti neutralizacijskih protutijela smatra se izostanak specifičnog virusnog citopatogenog učinka (CPU) na stanicama u jažicama u kojima se nalazi pretraživani serum. Serumi se pretražuju u razrjeđenjima od 1:2 do 1:256, po

potrebi i više. Pri tumačenju rezultata testa mora se imati na umu da pojedini uzorci seruma mogu djelovati nespecifično citotoksično na stanice.

3.4. OPIS POSTUPKA

3.4.1. MATERIJALI

Uzorak: serum

Pribor i oprema:

Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 10 – 100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),

Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 100 do 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),

Višekanalna automatska mikropipeta zapremine 10 - 100 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),

Sterilni nastavci za pipete,

Epruvete zapremine 1.5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),

Epruvete zapremine 15 i 50 ml (Falcon. BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey),

Mikrotitracijske plitice s 96 jažica, ravnim dnom i poklopcem,

Plastične bočice za rad sa staničnim kulturama,

Vodootporni marker,

Lateks rukavice,

Stalak za Eppendorf epruvete,

Samoljepljive naljepnice,

Samoljepljiva traka,

Termostat s CO₂ 37°C,

Vodena kupelj 56°C,

Autoklav (AV500x700) (INKOlab d.o.o.),

Laminarna komora (LFVP 12) (Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija),

Invertni svjetlosni mikroskop (Olympus, Tokio, Japan),

Hladnjak sa temperaturom +4 °C,
Hladnjak sa temperaturom -20 °C,
Hladnjak za duboko smrzavanje sa temperaturom -90 °C,
Radni obrazac za izvođenje i evidenciju VN-testa.

Reagensi:

Dulbeccov modificirani medij Eagle (*engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM*),
5 %-tni goveđi fetalni serum (*engl. Fetal calf serum - FCS*)
E6 Vero stanice 2×10^5 /ml DMEM-a obogaćenog sa FCS-om,
Virus SARS-CoV-2 Alfa varijanta (11239) 25 TCID₅₀,
Virus SARS-CoV-2 Delta varijanta (78019) 25 TCID₅₀,
Virus SARS-CoV-2 Omikron varijanta (OMI-5) 25 TCID₅₀.

3.4.2. IZVOĐENJE POSTUPKA

Ovisno o broju pretraživanih seruma, odredi se broj potrebnih mikrotitracijskih plitica s ravnim dnom. Prethodno se vodootpornim markerom na poklopcu označe pozicije pojedinih seruma. U svaku jažicu mikrotitracijske plitice doda se po 25 µl DMEM-a obogaćenog 5 %-tnim FCS-om, osim u jažicama u kojima se radi kontrola stanica i svim jažicama H reda u koje se dodaje ispitujući serum. Kontrola stanica radi se pri izvođenju svakog VN-testa. U jažicama A1 do A4 i B1 do B4 stavlja se po 50 µl DMEM-a sa FCS-om. Na prvoj plitici u razini H5 i H6 kreće se s pretraživanim uzorcima a prethodno se stavlja 37,5 µl DMEM-a sa FCS-om. Ista količina potom se postavlja u H redovima ostalih plitica. Razrijeđenja pretraživanih seruma načine se u dva stupca jažica mikrotitracijske plitice tako da se u H redu doda po 12,5 µl ispitujućih seruma. Sadržaj jažica mješa se na način da se najmanje 5 puta navuče pipetom i zatim ispusti u istu jažicu. Zatim se pipetom prebacuje po 25 µl izmješanog sadržaja iz H reda u G red gdje se opet sadržaj promješa na opisani način. Postupak prebacivanja i mješanja nastavlja se sve do A reda iz kojeg se na kraju mješanja odbaci 25 µl sadržaja. Navedenim postupkom načine se dvostruka razrijeđenja seruma od 1:4 do 1:512 (**Slika 5.**).



Slika 5. Prikaz mikrotitracijske plitice i postavljanja testa. Plitica broj jedan ima označena područja za kontrolu stanica, deseterostruka uzastopna razrijeđenja standardne virusne doze (100/10/1/0.1) i pretraživane serume (S1 do S4). Na plitici broj 7 označen je postupak razrijeđivanja pretraživanih seruma i postignuta razrijeđenja u pojedinim redovima.

U svakom izvođenju VN-testa potrebno je kontrolirati standardnu virusnu dozu (SVD). Postupak se izvodi na prvoj mikrotitracijskoj plitici deseterostrukim uzastopnim razrijeđenjima SVD. Razrijeđenja se pripremaju u četiri Eppendorf epruvete. U prvu se stavi 450 μ l virusa u SVD, a u ostale tri po 450 μ l DMEM-a sa FCS-om. Iz prve bočice 50 μ l virusa u SVD prebaci se u drugu bočicu te pipetiranjem promiješa. Zatim 50 μ l iz druge u treću i iz treće u četvrtu bočicu. Nakon što su napravljena razrijeđenja sadržaj se može prenjeti na pliticu. Iz prve bočice u kojoj je virus u SVD od 100 TCID₅₀ dodaje se po 25 μ l sadržaja u jažice od H1 do C1. Sadržaj druge bočice u kojoj je virus razrijeđen na 10 TCID₅₀ dodaje se po 25 μ l u jažice H2 do C2. Iz treće u kojoj je SVD razrijeđena na 1 TCID₅₀ ista količina ide u jažice H3 do C3 te konačno iz četvrte gdje je virus razrijeđen na 0.1 TCID₅₀ prenese se sadržaj u jažice H4 do C4.

U sve ostale jažice svih plitica, osim kontrole stanica, stavi se po 25 μ l standardne virusne doze koji sadrži 25 TCID₅₀. Plitice se zatim inkubiraju 1 h u termostatu s 5% CO₂ pri 37 °C nakon čega se u sve jažice svih plitica dodaje po 50 μ l suspenzije prethodno pripremljenih stanica E6 Vero. Suspenzija stanica se načini u DMEM-u u koji je dodato 5% (v/v) goveđeg fetalnog seruma. Plitice pripremljene na opisani način inkubiraju se u termostatu s 5% CO₂ pri 37 °C do očitavanja rezultata.

Navedeni postupak proveden je na sve tri korištene varijante SARS-CoV-2 pojedinačno i na potpuno isti način. Jedina razlika je standardna virusna doza, dobivena određenom računicom, koja iznosi drugačije za svaku varijantu, te vrijeme inkubacije odnosno dan očitavanja rezultata (**Tablica 1.**).

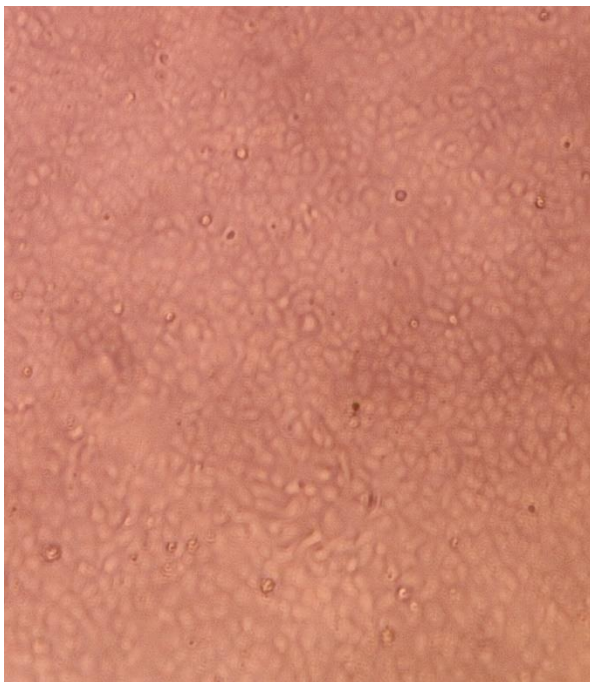
Tablica 1. Prikaz potrebnih razrijeđenja i vremena inkubacije za pojedine varijante.

Virusna varijanta	Potrebno razrijeđenje za SVD (25 TCID₅₀)	Vrijeme inkubacije
Alfa (11239)	68,85	72 sata
Delta (78019)	106,65	72 sata
Omikron (OMI-5)	1,28	96 sati

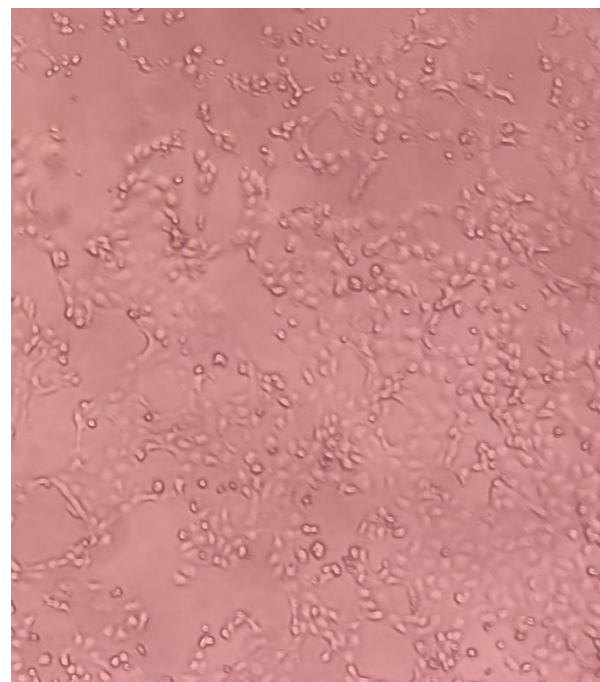
Rezultati se očitavaju nakon proteklog potrebnog vremena inkubacije. Prvo se pregledava kontrolna stanica. Jažice sa kontrolom stanica moraju sadržavati konfluentan sloj E6 Vero stanica (**Slika 6.**). Ako se primjete bilo kakve naznake toksičnog ili CPU pretraga je nevaljana. Ukoliko je kontrolna stanica zadovoljavajuća mogu se očitavati daljnji rezultati.

Jažice u kojima se radi kontrolna titracija SVD provjeravaju se na prisunost CPU. On mora biti prisutan u svim jažicama u kojima je dodano 100 i 10 TCID₅₀ virusa te u dvije do četiri jažice u kojima je 1 TCID₅₀. Ukoliko titracija standardne virusne doze ne pokaže CPU u jažicama sa 100 i 10 i 1 TCID₅₀, ploče se moraju ponovno inkubirati dok se ne postigne željena vrijednost. Ukoliko titracija pokaže CPU i u jažicama sa 0.1 TCID₅₀, količina virusa je veća od najveće dozvoljene te je pretraga nevaljana.

Jažice u kojima udio stanica zahvaćenih CPU-om prelazi 50% cijelog sloja stanica označavaju se kao negativne na radnim obrascima (**Slika 7.**). Jažice u kojima nije izražen CPU ili on ne prelazi 50% cijele površine stanica označavaju se kao pozitivne. Svi serumi u kojima nije izražen CPU na razrijeđenju 1:8 i više smatraju se pozitivnima na prisustvo SARS-CoV-2 protutijela. Titar protutijela određen je posljednjim razrijeđenjem bez CPU-a.



Slika 6. Jedan sloj E6 Vero stanica.
Povećanje 4x/0,13 PhL



Slika 7. Izražen je citopatogeni učinak virusa SARS- CoV-2. Povećanje 4x/0,13 PhL

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (*data analysis software system*), verzija 12. Software.dell.com (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike provedeni su razni testovi analitičke ili inskriptivne statistike. Prvo su zasebno ispitani psi i mačke a zatim usporedno njihova povezanost. Za određivanje povezanosti uzorka sa dvije nominalne varijable korišten je Cramer V omjer izgleda (povezanost Alfa-Delta, Alfa-Omikron i Delta-Omikron skupina). Razina značajnosti tih rezultata određena je McNemar testom za zavisne uzorke nominalnih varijabli. Korelacija titrova između navedenih skupina ispitana je Spearmanovim koeficijentom korelacije ranga. To je neparametarski test za mjerenje razine povezanosti dvije brojčane varijable unutar uzorka. Friedmanova ANOVA, kao neparametarski test za povezanost tri ili više zavisnih skupina, korištena je zbog potvrde povezanosti visine tirova korištenih varijanti. Metoda je upotpunjena post hoc Wilcox paired testom sa Bonferroni korekcijom kojim se potvrđuje koje su to značajno povezane varijante obzirom na visinu tirova. Kako bi se odredio utjecaj spola kao epizootiološkog čimbenika, omjer izgleda ispitao je povezanost spola i pozitivnih uzoraka obzirom na različite varijante virusa, dok je t-testom određena razlika visine tirova među spolovima. Logističkom regresijom gdje je dob kontinuirana varijabla određen je utjecaj dobi kao još jednog epizootiološkog čimbenika. Povezanost skupine pasa i skupine mačaka ispitana je omjerom izgleda. Pri analitičkoj obradi podataka korištena je razina značajnosti $p=0,05$. Osim pretražene seroprevalencije, seroprevalencije po varijantama, razlike u titrovima te obzirom na spol i dob, ispitan je značaj povezanosti kliničkih simptoma. Životinje su prema kliničkoj slici prilikom prvog pregleda grupirane u šest skupina prema zahvaćenosti organskog sustava: akutno respiratorna, kronično respiratorna, akutni gastroenteritis, kronični gastroenteritis te neurološka i kardiološka skupina. Kao referentna skupina za analizu kliničkih znakova korištene su sve jedinke koje se nisu mogle svrstati u navedene kategorije. Za analizu utjecaja seropozitivnosti na zdravlje životinja korištena je ANOVA. Da bi se odredila sukladnost korištenog modela u ovoj analizi korištena je vrijednost McFadden-ovog kvadriranog koeficijenta determinacije (R_{McF}^2).

4. REZULTATI

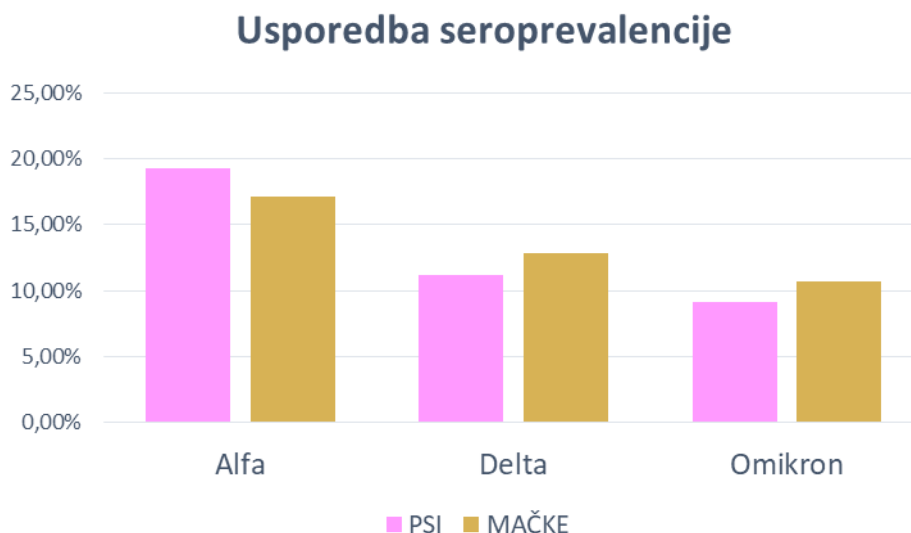
Istraživanjem je obuhvaćeno 436 životinja, od toga 296 pasa te 140 mačaka. Skupinu pasa u najvećoj mjeri čine križanci 30,7%, ostatak 69,3% čine labrador retrieveri, njemački ovčari, patuljasti gubičari i mnoge druge pasmine. Od 296 pasa samo 2,9% životinja potječe iz skloništa za nezbrinute životinje, ostatak su psi u privatnom vlasništvu. Obzirom na geografsku raširenost 94,3% ih je iz Grada Zagreba i Zagrebačke županije, 5,7% je iz ostalih dijelova Republike Hrvatske. Pasminska struktura populacije mačaka relativno je slična psima. Najveći broj životinja pripada domaćoj pasmini, 86,4%, ostatak čine maine coon, ruska plava, bengalska pasmina te nekoliko drugih. Od 140 životinja 2,9% pripada skloništima za nezbrinute životinje, te slično kao kod pasa, 94,3% potječe iz Grada Zagreba i Zagrebačke županije.

Kod određivanja seroprevalencije SARS-CoV-2 u pretraživanoj populaciji pasa i mačaka, pozitivnim su smatrani svi uzorci seruma koji su dali pozitivan rezultat VN-testa sa barem jednom od korištenih varijanti virusa. U promatranom razdoblju, u 65 uzoraka seruma pasa i 26 seruma mačaka dokazana je neutralizacijska aktivnost. Ovo daje vrijednost seroprevalencije od 21,9% u pasa i 18,6% u mačaka. Iako je vrijednost seroprevalencije u mačaka manja, koristeći hi-kvadrat test nije dokazana statistička značajnost ove razlike ($\chi^2= 0,66$; $df=2$; $p= 0,42$).

Od 65 pozitivno testiranih uzoraka seruma pasa 57 je dalo pozitivan rezultat kod testiranja Alfa varijante, 33 kod Delte i 27 kod Omikrona. Od 57 uzoraka pozitivnih na Alfa varijantu, 22 uzorka (33,8% svih pozitivnih uzoraka) pozitivna su samo na Alfu, dok na Deltu i Omikron nisu. Od 33 uzorka pozitivna na Delta varijantu 14 uzoraka (21,5% svih pozitivnih uzoraka) seruma neutraliziralo je samo Delta varijantu, te kod Omikrona od 27 pozitivnih samo 5 (7,7% svih pozitivnih uzoraka) nije neutraliziralo sa druge dvije testirane varijante. Ostalih 37% svih pozitivnih uzoraka dalo je pozitivan rezultat kod barem dvije ili sve tri testirane varijante virusa. Usporedbom 26 pozitivnih uzoraka seruma mačaka primjećeno je da su 24 uzorka dala pozitivan rezultat pri testiranju Alfa varijante, 18 je pozitivno testiranjem Delte i 14 je dalo pozitivan rezultat testiranjem Omikron varijante virusa. Od 24 uzorka pozitivna na Alfa varijantu samo 4 uzorka (15,4% svih pozitivnih uzoraka) nisu neutralizirala Delta i Omikron varijantu. Od 18 pozitivnih na Delta varijantu 1 (3,8% svih pozitivnih uzoraka) je neutralizirao samo Deltu, a kod testiranja Omikrona svih 14 uzoraka neutraliziralo je barem još jednu testiranu varijantu virusa.

Ovisno o varijanti virusa koji je korišten u izvedbi VN-testa udio pozitivnih uzoraka seruma se kod pasa kretao od 9,1 % za Omikron do 19,3 % za Alfa. Kod mačaka je također najmanji udio seruma neutralizirao Omikron varijantu (10,7 %), a najveći Alfa (17,1%) (**Tablica 2.**). Značajno je napomenuti da je zbog ograničene količine uzorka seruma bilo nemoguće načiniti pretragu za Delta varijantu u pet uzoraka pasa i tri uzorka mačaka. Vrijednosti omjera izgleda

pokazuju da su uzorci seruma mačaka u ovom istraživanju rijede davali pozitivan rezultat VN-testa za Alfa varijantu od pasa. Mačke su od pasa češće davale pozitivan rezultata VN-testa kada je korištena Delta ili Omikron SARS-CoV-2 (**Slika 8.**). Statističkom analizom nije dokazana značajnost uočenih razlika u pasa i mačaka (**Tablica 2.**).



Slika 8. Grafički prikaz usporedbe seroprevalencije pasa i mačaka po varijantama

Tablica 2. Seroprevalencija po varijantama

	Mačke	Psi	OR	CI	p vrijednost
Alfa	17,1 %	19,3 %	0,97	0,51- 1,47	0,6
Delta	12,9 %	11,2 %	1,18	0,64- 2,19	0,59
Omikron	10,7 %	9,1 %	1,2	0,61- 2,33	0,6

Usporedbom rezultata VN-testa u kojem je korištena Alfa, odnosno Delta varijanta SARS-CoV-2, kod pasa je dokazano da postoji jaka povezanost između kvalitativnog rezultata testa (Cramer V= 0,65; CI= 0,54- 0,77). Rezultat McNemarovog testa za zavisne uzorke pokazuje da postoji značajna razlika hoće li serum testirati pozitivan ili negativan ovisno o tome je li

korištena Alfa ili Delta varijanta u VN-testu ($p < 0,001$). Razina povezanosti je srednja (Cramer $V = 0,47$; $CI = 0,34 - 0,61$) za Alfa i Omikron. Ponovno McNemarov test pokazuje da rezultat VN-testa značajno ovisi o korištenoj varijanti virusa ($p < 0,001$). Varijante Delta i Omikron pokazale su također srednju razinu povezanosti rezultat VN-testa (Cramer $V = 0,53$; $CI = 0,38 - 0,7$). McNemarov test u ovom slučaju pokazuje da korištenje varijante Omikron ili Delta ne utječe značajno na to hoće li serum pasa dati pozitivan ili negativan rezultat ($p = 0,23$).

Kod mačaka usporedbom broja pozitivnih uzoraka VN-testa korištenjem Alfa i Delta varijante, dobivena je visoka razina povezanosti (Cramer $V = 0,79$; $CI = 0,65 - 0,94$). Omjer izgleda pokazuje da je vjerojatnost da će uzorak biti pozitivan, kada se koristi Alfa varijanta, 2,5 puta veći nego kada se koristi Delta ($OR = 2,5$; $CI = 0,41 - 26,25$; $p = 0,45$) međutim navedena razlika nije statistički značajna. Slični su rezultati dobiveni i kod usporedbe Delta i Omikron testiranih mačaka. Povezanost je niža nego Alfa-Delta, međutim i dalje visoka (Cramer $V = 0,72$; $CI = 0,55 - 0,91$). McNemar za zavisne uzorke pokazuje da pozitivni i negativni rezultat testa ne ovisi o tome je li korištena Delta ili Omikron varijanta ($OR = 3$; $CI = 0,54 - 30,39$; $p = 0,29$). McNemar za zavisne uzorke jedino je pokazao značajnost razlike u rezultatima VN-testa kada se koriste Alfa i Omikron varijanta kod mačaka. Broj pozitivnih rezultata VN-testa visoko je povezan (Cramer $V = 0,64$; $CI = 0,46 - 0,82$) sa značajno većim brojem Alfa pozitivnih nego Omikron pozitivnih ($OR = 5,5$; $CI = 1,2 - 51,07$; $p = 0,02$).

Usporedbom visine titrova 65 pozitivno testiranih uzoraka seruma pasa, primjećeno je da je 14 uzoraka rezultiralo najvišim titrom za Alfa varijantu, još 14 imalo je najviši titar za Delta varijantu i 3 su dala najviši titar za Omikron varijantu virusa.

Izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije vrijednosti titrova kod pasa, korištenjem varijanti Alfa i Delta, dokazana je srednja jačina korelacije koja je statistički značajna ($r_s = 0,39$; $CI = 0,21 - 0,64$; $p < 0,001$). Spearmanov koeficijent je pokazao statistički značajnu srednju razinu korelacije vrijednosti titra i kod Delta i Omikron varijante ($r_s = 0,4$; $CI = 0,11 - 0,61$; $p = 0,001$). Usporedba titrova dobivenih korištenjem Alfa i Omikron varijante pokazala je vrlo nisku razinu korelacije bez statističkog značaja ($r_s = 0,15$; $CI = -0,13 - 0,43$; $p = 0,24$). Friedmanova ANOVA pokazuje kako postoji značajna razlika vrijednosti titrova među sve tri pretražene varijante ($\chi^2 = 27,42$; $df = 2$; $p < 0,001$). Post hoc Wilcox pokazuje da su varijante među kojima postoji značajna razlika u visini titra Alfa i Omikron ($p < 0,001$), te Delta i Omikron ($p = 0,026$). Za Alfa i Delta varijante značajnost razlike visine titrova nije dokazana ($p = 0,274$).

Od ukupno 26 pozitivno testiranih uzoraka seruma mačaka samo 6 uzoraka rezultiralo je najvišim titrom za Alfa varijantu, dva su dala najviši titar za Delta i 5 je imalo najviši titar za Omikron varijantu virusa.

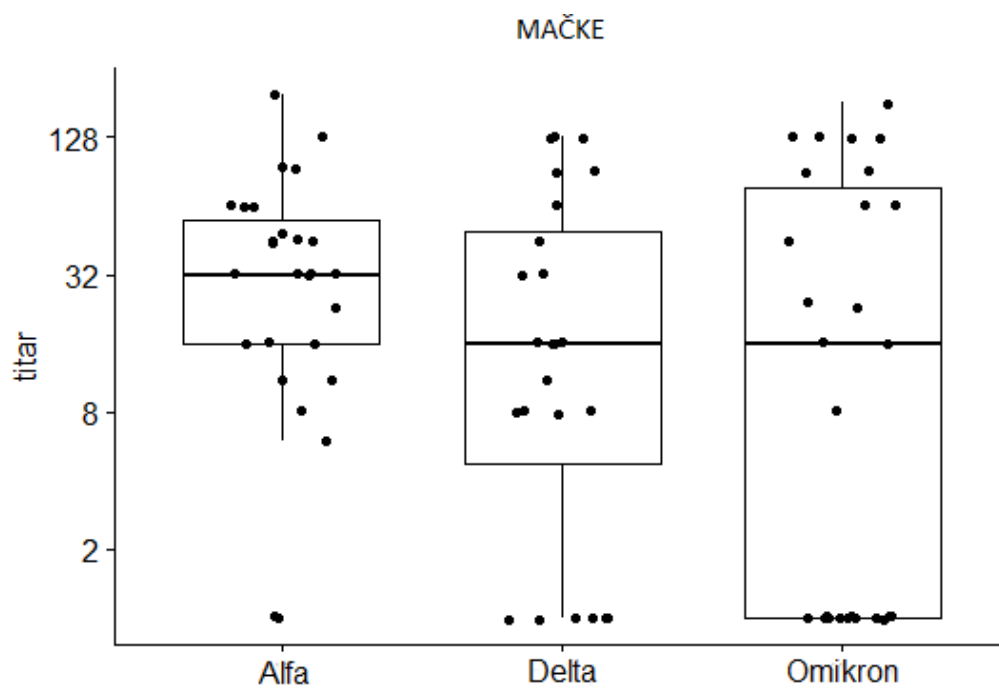
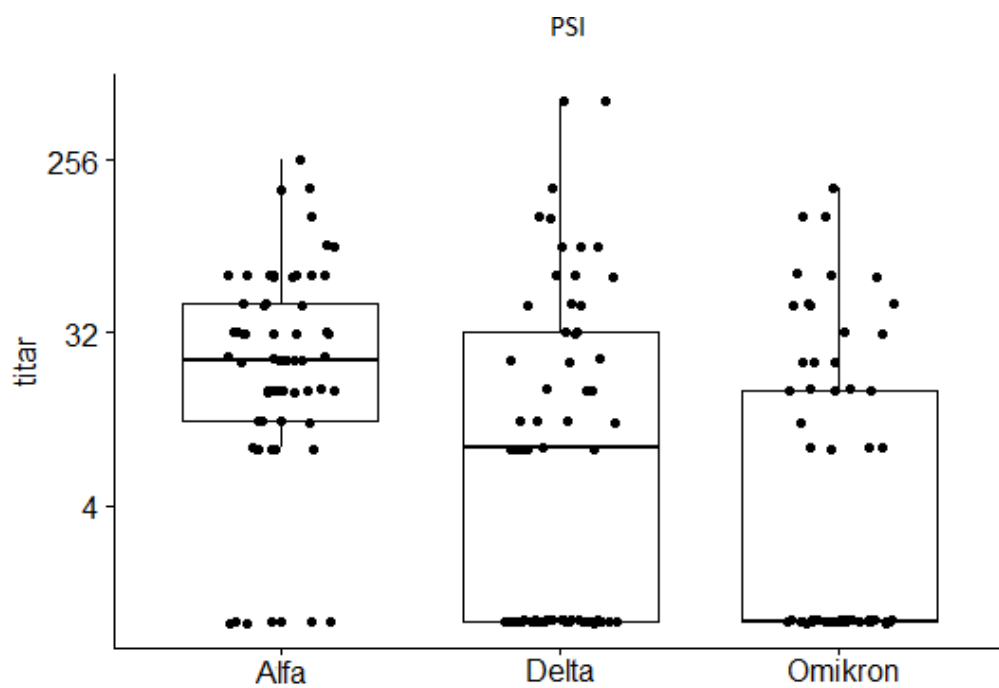
Za razliku od pasa, kod mačaka je dokazana srednje jaka statistički značajna korelacija vrijednosti visine titra neovisno o varijanti SARS-CoV-2 koja se koristi. Spearmanov

koeficijent korelacije visine titra za Alfa i Delta varijantu iznosi $r_s = 0,5$ (CI= 0,16- 0,7; $p = 0,01$), te je istovjetan za Alfa-Omikron ($r_s = 0,5$; CI= 0,18- 0,73; $p = 0,008$) a najviši je za Delta-Omikron $r_s = 0,65$ (CI= 0,34- 0,83) s najnižom vrijednosti p ($p < 0,001$). Friedmanova ANOVA kod mačaka dokazuje da nema značajne razlike u visini titrova pozitivnih uzoraka među sve tri testirane varijante ($\chi^2 = 1,9506$; $df = 2$; $p = 0,3771$).

Raspon dobivenih vrijednosti visine titrova u pasa i mačaka te mjere centralne tendencije za sve tri korištene varijante virusa prikazan je tablično (**Tablica 3.**). Za usporedbu srednje vrijednosti visine titra korišten je Studentov t-test. Geometrijska sredina vrijednosti titra se nije statistički značajno razlikovala između mačaka i pasa za Alfa varijantu ($p = 0,22$), kao niti za Delta varijantu ($p = 0,68$). Usporedbom vrijednosti titrova dokazana je znatna razlika samo za Omikron varijantu, pri čemu uzorci mačaka imaju znatno više titrove u odnosu na uzorke pasa ($p = 0,04$) (**Slika 9.**).

Tablica 3. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova

	PSI		MAČKE	
	GM	RASPON	GM	RASPON
Alfa	42,4	<1:8 – 1:256	36,65	<1:8 – 1:196
Delta	32,62	<1:8 – 1:512	28,47	<1:8 – 1:128
Omikron	27,78	<1:8 – 1:181	53,48	<1:8 – 1:181



Slika 9. Logaritamski prikaz razlike visine titrova među varijantama kod pasa i mačaka.

Od ukupnog broja pasa uključenih u istraživanje 50,7% su bile muške jedinke i 49,3% kuje. Spolna struktura pozitivnih i negativnih seruma prikazana je tablično (**Tablica 4.**).

Tablica 4. Spolna struktura pozitivnih i negativnih seruma pasa.

PSI	MUŽJACI		ŽENKE	
	POZITIVNI	NEGATIVNI	POZITIVNI	NEGATIVNI
Alfa	18,68%	81,33%	19,86%	80,14%
Delta	11,49%	88,51%	11,19%	88,81%
Omikron	10%	90%	8,22%	91,78%

Usporedbom rezultata VN-testa nije dokazan statistički značajan utjecaj spola na broj pozitivnih uzoraka kod testiranih varijanti. Kod Alfa varijante omjer izgleda je iznosio 0,93 (CI= 0,52- 1,65) međutim nije bio statistički značajan ($p= 0,79$). Za Delta varijantu omjer izgleda je iznosio 1,03 (CI= 0,5- 2,13) uz $p= 0,94$. Konačno, omjer izgleda da će serum, ovisno o spolu, neutralizirati Omikron varijantu je iznosio 1,24 (CI= 0,56- 2,75), ali utjecaj spola nije bio statistički značajan uz $p= 0,59$. Za ispitivanje utjecaja spola na visinu titra korišten je Studentov-t test (**Tablica 5.**). Geometrijska sredina dobivenih titrova se nije razlikovala između muških i ženskih životinja niti za Alfa ($p= 0,61$), Delta ($p= 0,28$) niti Omikron varijantu ($p= 0,78$).

Tablica 5. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova pasa i kuja.

PSI	MUŽJACI		ŽENKE	
	GM	RASPON	GM	RASPON
Alfa	25,35	1:8 – 1:64	32,04	1:8 – 1:256
Delta	40,83	1:8 – 1:181	26,69	1:8 – 1:512
Omikron	26,56	1:8 – 1:128	29,40	1:8 – 1:181

U populaciji mačaka, obuhvaćenju istraživanjem, zastupljenije su bile muške životinje s 57,9% dok ženskih životinja ima 42,1%.

Tablica 6. Spolna struktura pozitivni i negativnih seruma mačaka.

MAČKE	MUŽJACI		ŽENKE	
	POZITIVNI	NEGATIVNI	POZITIVNI	NEGATIVNI
Alfa	17,28%	82,72%	16,95%	83,05%
Delta	12,66%	87,34%	13,79%	86,21%
Omikron	13,58%	86,42%	6,78%	93,22%

Usporedbom rezultata VN-testa, kao i kod pasa, kod mačaka nije dokazan statistički značajan utjecaj spola na broj pozitivnih uzoraka kod testiranih varijanti (**Tablica 6.**). Kod Alfa varijante omjer izgleda iznosi 1,02 (CI= 0,42- 2,5) ali utjecaj spola nije statistički značajan uz $p= 0,96$. Kod Delta varijante omjer izgleda iznosio je 0,91 (CI= 0,33- 2,46) uz $p= 0,85$. I kod posljednje testirane Omikron varijante omjer izgleda iznosio je 2,16 (CI= 0,65- 7,16) te niti tu nije dokazan statistički značajan utjecaj spola ($p= 0,2$). Studentovim t-testom nije dokazan utjecaj spola na visinu titra (**Tablica 7.**). P-vrijednost za Alfa varijantu iznosila je $p= 0,66$, Delta $p= 0,21$ i Omikron $p= 0,45$.

Tablica 7. Usporedba srednjih vrijednosti visine titrova mužjaka i ženki mačaka.

MAČKE	MUŽJACI		ŽENKE	
	GM	RASPON	GM	RASPON
Alfa	49,43	1:8 – 1:196	39,91	1:16 – 1:128
Delta	37,99	1:8 – 1:128	19,86	1:8 – 1:128
Omikron	60,18	1:16 – 1:181	38,67	1:8 – 1:128

Raspon dobi pasa kreće se od šest mjeseci do 17 godina života. Broj uzoraka unutar raspona relativno je jednoliko raspoređen. Metodom logističke regresije ispitana je povezanost dobi i broja pozitivnih uzoraka. Utvrđeno je da nema značajne poveznice između broja pozitivnih uzoraka i dobi životinja kod Alfa (OR= 0,99; CI= 0,93- 1,05; p= 0,7), Delta (OR= 1,03; CI= 0,96- 1,11; p= 0,41) i Omikron (OR= 0,98; CI= 0,9- 1,07; p= 0,71) varijante. Logistička regresija korištena je i za ispitivanje utjecaja dobi na visnu titra. Omjer izgleda za Alfa varijantu iznosio je 0,99 (CI= 0,97- 1,01), no nije bilo statističkog značaja (p=0,39). Za Delta varijantu omjer izgleda iznosio je 0,99 (CI= 0,95- 1,03) uz p=0,54. Omjer izgleda za Omikron varijantu iznosio je 1 (CI= 0,97- 1,04) te niti kod njega nije zabilježen statistički značajan utjecaj (p=0,79).

Dob uzorkovanih mačaka kreće se od 11 mjeseci do 18 godina. Utjecaj dobi na rezultat VN-testa testiran je, kao i kod pasa, metodom logističke regresije. Značajna poveznica između dobi i broja pozitivnih uzoraka nije utvrđena kod Alfa (OR= 1,03; CI= 0,94- 1,12; p= 0,56), Delta (OR= 1,04; CI= 0,95- 1,15; p= 0,38) niti Omikron varijante (OR 1,02; CI= 0,92- 1,13; p= 0,66). Za utjecaj dobi na visinu titra, kao i psima, statistički značajan utjecaj nije dokazan za Alfa i Delta varijantu. Omjer izgleda za Alfa varijantu iznosio je 0,99 (CI= 0,96- 1,03) uz p=0,67, dok je za Delta 1,01 (CI= 0,95- 1,07) uz p= 0,82. Za razliku od pasa, kod Omikron varijante dokazan je utjecaj dobi na visinu titra. Omjer izgleda za Omikron varijantu iznosio je 1,05 (CI= 1- 1,09) uz p= 0,049.

Obzirom na pasminsku strukturu uzorka, geografsku i vlasničku pripadnost, utjecaj navedenih epizootioloških čimbenika na seroprevalenciju nije bilo moguće adekvatno statistički analizirati.

Da bi se ispitaio mogući utjecaj infekcije SARS-CoV-2 na zdravlje pasa i mačaka načinjena je analiza razlike varijance (ANOVA tip 2). Kod pretraženih pasa ANOVA nije pokazala utjecaj serološkog statusa na kliničku sliku kod prvog prijema neovisno je li korištena Alfa varijanta SARS-CoV-2 (p= 0,63) ili Delta varijanta (p= 0,55). McFadden-ov kvadrirani koeficijent determinacije kod alfa varijante je iznosio $R_{McF}^2 = 0,01$, a kod delta $R_{McF}^2 = 0,02$. Niske vrijednosti R_{McF}^2 ukazuju da je samo manji dio kliničke slike objašnjen seroprevalencijom u pasa. ANOVA nije pokazala značajan utjecaj neutralizacije Omikron varijante i kliničke slike, vrijednost $R_{McF}^2 = 0,05$ govori da je mali dio podataka sukladan korištenom modelu. Sa druge strane, načinjena analiza za svaku pojedinačnu kliničku kategoriju pokazuje da je statistički značajno više Omikron pozitivnih pasa pokazivalo znakove akutnog gastroenteritisa (**Tablica 8.**).

Tablica 8. Značaj razlike prevalencije obzirom na kliničku sliku pasa.

PSI	ALFA			DELTA			OMIKRON		
	OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p
AGE	0,81	0,3 – 1,93	0,67	0,52	0,10 – 1,71	0,31	0,12	0,0009 – 0,89	0,03
AR	1,8	0,31 – 7,78	0,47	3,36	0,58 – 14,86	0,16	2,03	0,21 – 10,38	0,48
KARDIO	1,15	0,33 – 3,24	0,81	1,57	0,39 – 4,89	0,49	1,26	0,24 – 4,42	0,75
KGE	2,83	0,45 – 15,05	0,24	2,46	0,24 – 14,06	0,39	2,93	0,28 – 16,09	0,31
KR	0,44	0,003 – 4,25	0,54	0,82	0,006 – 8,08	0,89	0,98	0,007 – 9,69	0,99
N	0,65	0,17 – 1,88	0,45	0,86	0,17 – 2,92	0,83	1,43	0,36 – 4,4	0,57

Kod mačaka ANOVA test nije pokazao značajnu povezanost kliničke slike i neutralizacijske aktivnosti seruma za Alfa ($p=0,55$) i Delta ($p=0,09$) varijantu. Kao i kod pasa R_{McF}^2 vrijednosti su bile niske, 0,04 odnosno 0,1, te je načinjena statistička analiza omjera izgleda svake pojedine kategorije. Mačke s kroničnim respiratornim kliničkim znakovima statistički su značajno češće bile pozitivne na protutijela za Alfa ($p=0,04$) i Delta ($p=0,02$) varijantu. Mačke čiji uzorci seruma pokazuju neutralizaciju Delta varijante statistički značajno češće su se nalazile u skupini životinja s akutnim gastroenteritisom ($p=0,02$). Za Omikron varijantu ANOVA je pokazala značajan utjecaj kliničke slike na ishod VN-testa ($p=0,02$). Istovremeno je R_{McF}^2 iznosio 0,15 što je i najviša vrijednost od svih navedenih analiza. Statistička analiza pojedinih kliničkih kategorija je pokazala da mačke s kroničnim respiratornim kliničkim znakovima najčešće daju pozitivan rezultat VN-testa kada se koristi Omikron varijanta u izvođenju ($p=0,003$) (**Tablica 9.**).

Tablica 9. Značaj razlike prevalencije obzirom na kliničku sliku mačaka.

MAČKE	ALFA			DELTA			OMIKRON		
	OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p
AGE	2,47	0,23 – 16,37	0,40	10,41	1,44 – 76,24	0,02	5,17	0,46 – 36,89	0,16
AR	1,25	0,23 – 4,87	0,77	2,26	0,39 – 9,59	0,33	0,45	0,003 – 4,05	0,55
KARDIO	1,33	0,13 – 7,04	0,77	2,40	0,23 – 13,63	0,40	2,78	0,27 – 16,15	0,34
KGE	2,47	0,23 – 16,36	0,40	1,49	0,01 – 17,39	0,81	1,34	0,009 – 14,64	0,85
KR	3,73	1,06 – 12,41	0,04	5,51	1,36 – 20,96	0,02	7,81	2,06 – 29,32	0,003
N	1,15	0,008 – 15,14	0,93	10,41	0,78 – 139,64	0,07	12,1	0,9 – 163,6	0,06

5. RASPRAVA

U trenutku pisanja rada pandemija COVID-19 još uvijek traje odnoseći brojne živote širom svijeta. Zbog pretpostavljenog životinjskog porijekla virusa, velike sklonosti mutacijama i preskakanju vrsnih barijera mnogo aspekata epidemiologije infekcije SARS-CoV-2 još uvijek je nedovoljno istraženo, a osobito veterinarski te javnozdravstveni značaj. Prve pokusne infekcije pokazale su različitu prijemljivost domaćih životinja na infekciju SARS-CoV-2. Mačke i domaće vretice bile su najpodložnije infekciji, dok psi, svinje, perad, goveda daleko manje (SCHLOTtau i sur., 2020.; SHI i sur., 2020.).

Izvan laboratorija, prva opisana infekcija SARS-CoV-2 u životinja bila je u pasa (SIT i sur., 2020.). Ovo je pokazalo koliko vanjski čimbenici mogu utjecati na epidemiologiju i epizootologiju infekcije u terenskim uvjetima. Iako je, kako je ranije navedeno, dokazana veća prijemljivost mačaka kao vrste, i njihova mogućnost umnažanja i prijenosa SARS-CoV-2 (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.), prvi slučaj opisan je u pasa. Najvjerojatniji uzrok ovome je razlika u ponašanju i držanju ove dvije vrste (STEVANOVIĆ i sur., 2021.a). Mačke vrlo često provode dio svog dana izvan boravišta svog vlasnika, te se na taj način smanjuje mogućnost infekcije. Sa druge strane, ovaj rezultat uz serološku studiju populacije mačaka u Wuhanu pokazao je da postoji razlog za zabrinutost. Zbog bliskog suživota sa vlasnicima psi i mačke,

kao najčešći kućni ljubimci, su pod vrlo velikim rizikom od infekcije te, ukoliko mogu biti izvor infekcije, njihov značaj u epidemiologiji bolesti može biti velik.

Ovo istraživanje imalo je kao osnovni cilj ustanoviti seroprevalenciju odnosno proširenost infekcije SARS-CoV-2 u pretraženoj populaciji pasa i mačaka. Uzorci su pretraženi VN-testom za dokaz SARS-CoV-2 neutralizirajućih protutijela. VN-test bila je metoda izbora iz dva razloga. Kako je ranije navedeno zbog bliskog suživota s ljudima kućni ljubimci su izloženi velikoj količini virusa koji izlučuje vlasnik i kontaminira neposredni okoliš (DHAKAL i sur., 2021.). Kućni ljubimci u ovom slučaju mogu također biti kontaminirani uzročnikom COVID-19, te ponašati se kao vehikulumi i pasivno sadržavati virus na površini tijela i sluznicama prirodnih otvora bez razvoja infekcije. Serokonverzija, odnosno dokaz protutijela, nepobitan je dokaz infekcije. Zbog mogućih križnih reakcija izabrana je VN-test metoda. Iako je ova metoda izrazito zahtjevna za izvođenje zbog izrazite specifičnosti smatra se zlatnim standardom dokaza protutijela za SARS-CoV-2 (PERERA i sur., 2020.). Drugi razlog izbora dokaza protutijela je mogućnost istraživanja dugoročnih posljedica na zdravlje životinja infekcije SARS-CoV-2. Kako se u ovom istraživanju u ispitivanih jedinki dokazuju protutijela koja se pojavljuju u serumu životinja nekoliko dana od infekcije (BOSCO-LAUTH i sur., 2020.), istraživanjem je bilo moguće ispitati klinički značaj infekcije i u životinja koje nisu akutno inficirane.

Seroprevalencija SARS-CoV-2 neutralizirajućih protutijela u ovom istraživanju je bila 21,9% u pasa i 18,6% u mačaka. U Republici Hrvatskoj praćenje infekcije SARS-CoV-2 u kućnih ljubimaca započelo je 26. veljače 2020. samo dan nakon prvog humanog slučaja. Upravo stoga je moguće pratiti kretanje seroprevalencije od početka pandemije u Republici Hrvatskoj. Prvo istraživanje koje je obuhvaćalo pse i mačke od 26. veljače do 15. lipnja 2020. pokazalo je neutralizacijska protutijela u 0,76% mačaka i 0,31% pasa (STEVANOVIĆ i sur., 2021.a). U periodu od 1. lipnja do 31. prosinca 2020. neutralizacijska protutijela su dokazana u 2,2% pasa u općoj populaciji i 25,6% pasa iz COVID-19 pozitivnih kućanstava (STEVANOVIĆ i sur., 2021.b). U prosincu 2020. 13,8% mačaka je pokazalo pozitivnu reakciju imunoenzimnim testom (VILIBIĆ-CAVLEK i sur., 2021.b). Iz navedenih podataka vidljivo je da je seroprevalencija značajno porasla u obje vrste istraživanih životinja. Gotovo svaki peti pas i mačka u ovom istraživanju bili su zaraženi SARS-CoV-2 te je ovaj virus postao značajan patogen i pasa i mačaka. Nadalje važno je naglasiti da kako je pokazano u prvom istraživanju u Hrvatskoj i u ovom istraživanju seroprevalencija se nije razlikovala značajno između pasa i mačaka te su infekcije u terenskim uvjetima podjednako česte neovisno o rezultatima pokusnih infekcija.

U ovom istraživanju korišteni su izolati Alfa, Delta i Omikron varijante SARS-CoV-2 koje su bile odgovorne za pojavu epidemijskih valova u ljudi kako u Hrvatskoj tako i u svijetu (FERENČAK i sur., 2022.). U ljudi je dokazano da postoji djelomična križna neutralizacija između Alfa i Delta varijante, dok ljudi inficirani Omikronom ne pokazuju neutralizaciju druge

dvije varijante (SURYAWANSHI i sur., 2022.). Djelomična križna neutralizacija između Alfa i Omikron varijante dokazana je i u sirijskih hrčaka, dok između Omikrona, Beta i Delte nije bilo neutralizacije (MOHANDAS i sur., 2022.). U pasa samo na Alfa varijantu bila su pozitivna 22 uzorka, Delta dva, a samo Omikron pet. Na ovaj način možemo govoriti o pet vrlo izglednih slučajeva infekcije pasa Omikron varijantom. Kod još tri psa Omikron je davao najviši titar. Kod mačaka nije bilo uzoraka seruma koji su neutralizirali samo Omikron, ali je neutralizacijski titar u pet životinja bio najviši za tu varijantu, a u jedne životinje neutralizacija Omikron varijante je gotovo devet puta viša od titra neutralizacije Alfa varijante. I u ovom slučaju možemo govoriti o pet slučajeva infekcije pasa Omikron varijantom te nedvojbeno barem jednom slučaju infekcije mačke ovom varijantom, što je ujedno i prvi ovakav opis u Hrvatskoj.

Usporedbom rezultata dobivenih korištenjem različitih varijanti SARS-CoV-2 u VN-testu također je ustanovljeno da izbor varijante uvelike utječe i na rezultat pretrage u pasa. Hoće li uzorak seruma dati pozitivnu reakciju značajno se razlikuje između Alfa i Delta, Alfa i Omikron varijante međutim ne između Omikron i Delta. Isto tako određena vrijednost titra neutralizacijskih protutijela za SARS-CoV-2 u pasa ovisi o korištenoj varijanti. Postoji značajna razlika između korištenja Alfa i Omikron, te Delta i Omikron varijante, međutim razlika titra kada se koristi Omikron i Delta varijanta nije izražena. Nalaz je važan iz dva razloga. Prvo, nepobitno je dokazano da se kod interpretacije rezultata VN-testa mora obratiti pažnja koja je varijanta virusa korištena. Sa druge strane dokazano je da postoji djelomična križna neutralizacija između varijanti. Ovo nam govori da se imunosni odgovor pasa razlikuje od odgovora kod čovjeka i sirijskog hrčka gdje protutijela za Omikron varijantu nisu neutralizirala druge varijante. Kod mačaka je križna neutralizacija još izraženija. Rezultat VN-testa razlikuje se samo između Alfa i Omikron varijanti. Posebno je zanimljiva činjenica da se jačina neutralizacije, mjerena kroz visinu titra, ne razlikuje između varijanti. Gotovo je sasvim izvjesno da se imunosni odgovor mačaka razlikuje od pasa, a sasvim sigurno od čovjeka te da je križna neutralizacija prisutna, osobito između Alfa i Delta te Delta i Omikron varijante. Potrebno je ispitati je li ova križna neutralizacija dovoljna i za zaštitu od infekcija.

Zanimljivo, u ovom istraživanju nije dokazana spolna i dobna predispozicija pasa i mačaka na infekciju SARS-CoV-2. Ovo je posebno značajno jer je u suprotnosti sa rezultatima prijašnjih istraživanja gdje su muški psi u određenoj dobi bili prijemljiviji na infekciju (STEVANOVIC i sur., 2021.b). Slično je dokazano i u ljudi, gdje je u početku pandemije postojala spolna i dobna dispozicija koja je kasnije prestala postojati (ABATE i sur., 2020.; PECKHAM i sur., 2020.; STALL i sur., 2020.). Iako su bila različita objašnjenja za ovu razliku u predispoziciji vrlo je vjerojatno da se epidemiologija i epizootiologija mijenja širenjem i evolucijom SARS-CoV-2. Iako u dostupnoj literaturi ne postoje dokazi da su psi i mačke značajan izvor infekcije za čovjeka, značajan broj pozitivnih životinja ukazuje da je potrebno nadzirati širenje infekcija u životinja koje su u bliskom kontaktu s čovjekom. Ovo je naglašeno i izmjenom čimbenika predispozicije gdje se vidi da se epizootiologija bolesti mijenja.

Zadnji dio ovog istraživanja bilo je ispitivanje kliničkog značaja infekcija SARS-CoV-2. Akutne infekcije s kliničkim znakovima gastroenteritisa i bolesti dišnog i krvožilnog sustava opisivane su i u pasa i u mačaka (GARIGLIANY i sur., 2020.; FERASIN i sur., 2021.). U humanoj medicini sve se više daje na značenju dugotrajnim posljedicama COVID-19, a koje zahvaćaju veliki broj različitih organskih sustava te mogu biti izrazito dugotrajne i vrlo teške (CHOPRA i sur., 2020.; GARRIGUES i sur., 2020.). U ovom istraživanju dokazano je da psi koji pokazuju znakove akutnog gastroenteritisa značajno češće imaju protutijela za Delta varijantu SARS-CoV-2. Kod mačaka je ovo bilo još značajnije, jer neovisno o varijanti sve pozitivne mačke su češće pokazivale znakove kronične respiratorne bolesti, a mačke s neutralizirajućim protutijelima za Delta varijantu i akutni gastroenteritis. Ovi rezultati govore da postoji velika vjerojatnost da infekcija SARS-CoV-2 ostavlja dugotrajne posljedice i na zdravlje životinja, kako je to zabilježeno i kod ljudi, te da se zdravstveni značaj infekcija ne smije prestati pratiti. Ovi rezultati su u suprotnosti s ranijim istraživanjem provedenim u pasa, kada su psi nakon infekcije češće oboljevali od akutnih neuroloških stanja (STEVANOVIĆ i sur., 2021.b). Međutim navedeno istraživanje provedeno je prije pojave Delta i Omikron varijante za koje se zna da imaju drugačiji tkivni tropizam od izvornog virusa (SURYAWANSHI i sur., 2022.).

6. ZAKLJUČCI

1. Uz seroprevalenciju od 21,9% u pasa i 18,6% u mačaka jasno je da je infekcija SARS-CoV-2 izrazito proširena u populaciji ovih životinja u Republici Hrvatskoj.
2. Kod interpretacije nalaza neutralizacijskog testa važno je voditi računa koja je varijanta korištena u izvođenju metode.
3. Psi i mačke se mogu inficirati sa sve tri ispitivane varijante (Alfa, Delta, Omikron) SARS-CoV-2 virusa.
4. Imunosni odgovor na infekciju SARS-CoV-2 u pasa i mačaka različit je od onoga u čovjeka uz značajne križne neutralizacije.
5. Infekcije SARS-CoV-2 virusom mogu ostaviti dugotrajne posljedice na zdravstveno stanje pasa i mačaka na način da ih predisponiraju na oboljenja, gastrointestinalnog sustava u pasa te gastrointestinalnog i respiratornog sustava u mačaka.
6. Potrebno je praćenje proširenosti infekcije SARS-CoV-2 u pasa i mačaka kao potencijalnih izvora infekcije za čovjeka, ali i u svrhu zaštite dobrobiti životinja.

7. LITERATURA

ACHAK, M., S. A. BAKRI, Y. CHHITI, F. E. M. H. ALAOUI, N. BARKA, W. BOUMYA (2021): SARS-CoV-2 in hospital wastewater during outbreak of COVID-19: A review on detection, survival and disinfection technologies. *Sci. Total Environ.* 761, 143-192.

ABATE, B. B., A. M. KASSIE, M. W. KASSAW, T. G. ARAGIE, S. A. MASRESHA (2020): Sex difference in coronavirus disease (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Brit. Med. J.* 10, 040129.

BAČENKOVÁ, D., M. TREBUŇOVÁ, T. ŠPAKOVSKÁ, M. SCHNITZER, L. BEDNARČÍKOVÁ, J. ŽIVČÁK (2021): Comparison of selected characteristics of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and HCoV-NL63. *Appl. Sci.* 11, 1497.

BARROSO, R., A. VIEIRA-PIRES, A. ANTUNES, I. FIDALGO-CARVALHO (2022): Susceptibility of Pets to SARS-CoV-2 Infection: Lessons from a Seroepidemiologic Survey of Cats and Dogs in Portugal. *Microorganisms* 10, 345.

BARROSO-AREVALO, S., A. BARNETO, A. M. RAMOS, B. RIVERA, R. SÁNCHEZ, L. SÁNCHEZ-MORALES, M. PÉREZ-SANCHO, A. BUENDÍA, E. FERRERAS, J. C. ORTIZ-MENÉNDEZ, I. MORENO, C. SERRES, C. VELA, M. A. RISALDE, L. DOMÍNGUEZ, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2021): Large-scale study on virological and serological prevalence of SARS-CoV-2 in cats and dogs in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 759-774.

BARROSO-AREVALO, S., L. SÁNCHEZ-MORALES, J. A. BARASONA, B. RIVERA, R. SÁNCHEZ, M. A. RISALDE, I. AGULLO-ROS, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2022a): Evaluation of the clinical evolution and transmission of SARS-CoV-2 infection in cats by simulating natural routes of infection. *Vet. Res. Commun.* 46, 1-16.

BARROSO-AREVALO, S., L. SÁNCHEZ-MORALES, M. DOMÍNGUEZ, T. GARCÍA-SECO, M. A. RISALDE, I. GARCÍA-BOCANEGRA, L. DOMINGUEZ, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO (2022b): A subunit vaccine candidate based on the Spike protein of SARS-CoV-2 prevents infectious virus shedding in cats. *Res. Vet. Sci.* 148, 52-64.

BEDDIAF, L., E. PHILIPPOTEAUX, C. GHERARDI, C. MIRANDA (2022): COVID-19 in pets: susceptibility to infection and potencial pet-to-human transmission. *RevSALUS-Revista Científica Internacional da Rede Académica das Ciências da Saúde da Lusofonia*, 4(Sup), 184.

BESSIÈRE, P., T. VERGNE, M. BATTINI, J. BRUN, J. AVERSO, E. JOLY, J. L. GUERIN, M. C. CADIERGUES (2022): SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals: Prospective Serological Survey and Risk Factor Analysis in France. *Viruses* 14, 1178.

BIENZLE, D., J. ROUSSEAU, D. MAROM, J. MACNICOL, L. JACOBSON, S. SPARLING, N. PRYSTAJECKY, E. FRASER, J. S. WEESE (2022): Risk Factors for SARS-CoV-2 Infection and Illness in Cats and Dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 1154-1162.

BOSCO-LAUTH, A. M., A. E. HARTWIG, S. M. PORTER, P. W. GORDY, M. NEHRING, A. D. BYAS, S. VENDEWOUDE, I. K. RAGAN, R. M. MAISON, R. A. BOWEN (2020): Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 26382-26388.

CHAN, J. F. W., G. K. H. SIU, S. YUAN, J. DANIEL, J. P. CAI, A. W. H. CHU, W. M. CHAN, S. M. U. ABDULLAH, C. LUO, B. P. C. CHAN, T. T. T. YUEN, L. L. CHEN, K. K. H. CHIK, R. LIANG, H. CAO, V. K. M. POON, C. C. S. CHAN, K. H. LEUNG, A. R. TAM, O. T. Y. TSANG, J. M. C. CHAN, W. K. TO, B. H. S. LAM, L. K. LEE, H. W. H. LO, I. T. F. WONG, J. S. L. LEUNG, E. Y. K. WONG, H. CHU, C. C. Y. YIP, V. C. C. CHENG, K. H. CHAN, H. TSE, D. C. LUNG, K. H. L. NG, A. K. W. AU, I. F. N. HUNG, K. Y. YUEN, K. K. W. TO (2022): Probable animal-to-human transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Delta variant AY. 127 causing a pet shop-related coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in Hong Kong. *Clin. Infect. Dis.* 75, 76-81.

CHIN, A. W., J. T. CHU, M. R. PERERA, K. P. HUI, H. L. YEN, M. C. CHAN, M. PEIRIS, L. L. POON (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet* 1, 10.

CHOPRA, V., S. A. FLANDERS, M. O'MALLEY, A. N. MALANI, H. C. PRESCOTT (2020): Sixty-day outcomes among patients hospitalised with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 174, 576-578

CLEARY, S. J., S. C. PITCHFORD, R. T. AMISON, R. CARRINGTON, C. L. ROBAINA CABRERA, M. MAGNEN, M. R. LOONEY, E. GRAY, C. P. PAGE (2020): Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *Br. J. Pharmacol.* 177, 4851-4865.

DE GROOT, J. RAOUL (2011): *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. U: Family coronaviridae, Elsevier, Nizozemska str. 806-828.

DHAKAL, J., M. JIA, J. D. JOYCE, G. A. MOORE, R. OVISSIPOUR, A. S. BERTKE (2021): Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and herpes simplex virus 1 (HSV-1) on foods stored at refrigerated temperature. *Foods* 10, 1005.

DO, H. Q., V. G. NGUYEN, C. U. CHUNG, Y. S. JEON, S. SHIN, K. C. JANG, L. B. HANG PHAM, A. KONG, C. U. KIM, Y. H. PARK, B. K. PARK, H. C. CHUNG (2021): Genomic characterization of a novel alphacoronavirus isolated from bats, Korea, 2020. *Viruses* 13, 2041.

ESAKANDARI, H., M. NABI-AFJADI, J. FAKKARI-AFJADI, N. FARAHMANDIAN, S. M. MIRE SMAEILI, E. BAHREINI (2020): A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol. Proced. Online* 22, 1-10.

FERASIN L., M. FRITZ, H. FERASIN, P. BECQUART, S. CORBET, M. AR GOUILH, V. LEGROS, E. M. LEROY (2021): Infection with SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 detected in a group of dogs and cats with suspected myocarditis. *Vet Rec.* 189, 944.

FERENČAK, I., M. OBROVAC, L. ŽMAK, J. KUZLE, G. PETROVIĆ, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, D. JURIĆ, A. JURIĆ, Ž. HRUŠKAR, K. CAPAK, V. STEVANOVIĆ, M. MILANOVIĆ, M. GOVEDARICA, D. VUJOŠEVIĆ, I. TABAIN (2022): SARS-CoV-2 Omicron Variant in Croatia—Rapid Detection of the First Case and Cross-Border Spread. *Pathogens* 11, 511.

FERNÁNDEZ-RAGA, M., L. DÍAZ-MARUGÁN, M. G. ESCOLANO, C. BORT, V. FANJUL (2021): SARS-CoV-2 viability under different meteorological conditions, surfaces, fluids and transmission between animals. *Environ. Res.* 192, 110293.

GA, E., Y. WON, J. HWANG, S. MOON, M. YEOM, K. LYOO, D. SONG, J. HAN, W. NA (2022). A COVID-19 Vaccine for Dogs Prevents Reverse Zoonosis. *Vaccines* 10, 676.

GARIGLIANY, M., A. S. VAN LAERE, C. CLERCX, D. GIET, N. ESCRIOU, C. HUON, S. VAN DER WERF, M. ELOIT, D. DESMECHT (2020): SARS-CoV-2 natural transmission from human to cat, Belgium, March 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 3069.

GARRIGUES, E., P. JANVIER, Y. KHERABI, A. LE BOT, A. HAMON, H. GOUZE, L. DOUCET, S. BERKANI, E. OLIOSI, E. MALLART (2020): Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalisation for COVID-19. *J. Infect.* 81, 4–6.

HAMER, S. A., R. R. GHAI, I. B. ZECCA, L. D. AUCKLAND, C. M. ROUNDY, E. DAVILA, R. E. BUSSELMAN, W. TANG, A. PAUVOLID-CORRÊA, M. L. KILLIAN, M. JENKINS-MOORE, M. K. TORCHETTI, S. R. AUSTERMAN, A. LIM, Y. AKPALU, R. S. B. FISCHER, C. B. BEHRAVESH, G. L. HAMER (2022): SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 variant of concern detected in a pet dog and cat after exposure to a person with COVID-19, USA. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 1656-1658.

HASÖKSÜZ, M., S. KILIC, F. SARAÇ (2020): Coronaviruses and sars-cov-2. *Turk. J. Med. Sci.* 50, 549-556.

HIROSE, R., H. IKEGAYA, Y. NAITO, N. WATANABE, T. YOSHIDA, R. BANDO, T. DAIDOJI, Y. ITOH, T. NAKAYA (2021). Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza virus on human skin: importance of hand hygiene in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 73, 4329-4335.

HOBBS, E. C., T. J. REID (2021): Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 1850-1867.

HOSIE, M. J., R. HOFMANN-LEHMANN, K. HARTMANN, H. EGBERINK, U. TRUYEN, D. D. ADDIE, S. BELAK, C. BOUCRAUT-BARALON, T. FRYMUS, A. LLORET, H. LUTZ, F. MARSILIO, M. G. PENNISI, S. TASKER, E. THIRY, K. MÖSTL (2021): Anthropogenic infection of cats during the 2020 COVID-19 pandemic. *Viruses* 13, 185.

HOSSEINI, M., S. BEHZADINASAB, Z. BENMAMOUN, W.A. DUCKER (2021): The viability of SARS-CoV-2 on solid surfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 55, 101481.

HU, B., H. GUO, P. ZHOU, Z. L. SHI (2021): Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 141-154.

HU, B., L. P. ZENG, X. L. YANG, X. Y. GE, W. ZHANG, B. LI, J. Z. XIE, X. R. SHEN, Y. Z. ZHANG, N. WANG, D. S. LUO, X. S. ZHENG, M. N. WANG, P. DASZAK, L. F. WANG, J. CUI, Z. L. SHI (2017): Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 13, 1006698.

ISLAM, A., J. FERDOUS, S. ISLAM, M.A. SAYEED, M. K. RAHMAN, O. SAHA, M. H. MOHAMMAD, T. SHIRIN (2022a). Transmission dynamics and susceptibility patterns of SARS-CoV-2 in domestic, farmed and wild animals: Sustainable One Health surveillance for conservation and public health to prevent future epidemics and pandemics. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 2523-2543.

ISLAM, A., M. A. SAYEED, M. A. KALAM, J. FEDOUS, S. SHANO, J. ABEDIN, S. ISLAM, S. D. CHOUDHURY, O. SAHA, M. M. HASSAN (2022b): Transmission Pathways and Genomic Epidemiology of Emerging Variants of SARS-CoV-2 in the Environment. *COVID 2022*, 2, 916-939.

IZES, A. M., J. YU, J. M. NORRIS, M. GOVENDIR (2020): Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats. *Vet. Q.* 40, 322-330.

KANG, K., Q. CHEN, Y. GAO, K. J. YU (2022): Detection of SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 (Delta) variant in three cats owned by a confirmed COVID-19 patient in Harbin, China. *Vet. Med. Sci.* 8, 945.

KHAILANY, R. A., M. SAFDAR, M. OZASLAN (2020): Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 19, 100682.

KIM, Y. I., S. G. KIM, S. M. KIM, E. H. KIM, S. J. PARK, K. M. YU, J. H. CHANG, E. J. KIM, S. LEE, M. A. B. CASEL, J. UM, M. S. SONG, H. W. JEONG, V. D. LAI, Y. KIM, B. S. CHIN, J. S. PARK, K. H. CHUNG, S. S. FOO, H. POO, I. P. MO, O. J. LEE, R. J. WEBBY,

J. U. JUNG, Y. K. CHOI (2020): Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell host Microbe* 27, 704-709.

KORATH, A. D., J. JANDA, E. UNTERSMAJR, M. SOKOLOWSKA, W. FELESZKO, I. AGACHE, A. A. SEIDA, K. HARTMANN, E. JENSEN-JAROLIM, I. PALI-SCHÖLL (2022): One Health: EAACI Position Paper on coronaviruses at the human-animal interface, with a specific focus on comparative and zoonotic aspects of SARS-CoV-2. *Allergy* 77, 55-71.

LORUSSO, A., P. CALISTRI, A. PETRINI, G. SAVINI, N. DECARO (2020): Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic: a veterinary perspective. *Vet. Ital.* 56, 5-10.

MAHER, M. C., I. BARTHA, S. WEAVER, J. DI IULIO, E. FERRI, L. SORIAGA, F. A. LEMPP, B. L. HIE, B. BRYSON, B. BERGER, D. L. ROBERTSON, G. SNELL, D. CORTI, H. W. VIRGIN, S. L. KOSAKOVSKY POND, A. TELENTI (2022): Predicting the mutational drivers of future SARS-CoV-2 variants of concern. *Sci. Transl. Med.* 14, 3445.

MARQUÈS, M., J. L. DOMINGO (2021): Contamination of inert surfaces by SARS-CoV-2: Persistence, stability and infectivity. *Environ. Res.* 193, 110559.

MASTUTIK, G., A. ROHMAN, R. I'TISHOM, I. RUIZ-ARRONDO, I. DE BLAS (2022): Experimental and natural infections of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 in pets and wild and farm animals. *Vet. World* 15, 565.

MAVRODIEV, E. V., M. L. TURSKY, N. E. MAVRODIEV, M. C. EBACH, D. M. WILLIAMS (2020): On Classification and Taxonomy of Coronaviruses (Riboviria, Nidovirales, Coronaviridae) with special focus on severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-Cov-2). *Math. Biol. Bioinf.* 17, 289-311.

MOHANDAS, S., P. D. YADAV, G. SAPKAL, A. M. SHETE, G. DESHPANDE, D. A. NYAYANIT, D. PATIL, M. KADAM, A. KUMAR, C. MOTE, R. JAIN (2022): Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron (R346K) variant in Syrian hamsters and its cross-neutralization with different variants of concern. *E Bio Medicine* 79, 103997.

MURPHY, H., H. LY (2022): What are the risk levels of humans contracting SARS-CoV-2 from pets and vice versa?. *Journal of Medical Virology*.

NADEAU, S. A., T. G. VAUGHAN, J. SCIRE, J. S. HUISMAN, T. STADLER (2021): The origin and early spread of SARS-CoV-2 in Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2012008118.

PAGLIANO, P., C. SELBITTO, G. SCARPATI, T. ASCIONE, V. CONTI, G. FRANCI, O. PIAZZA, A. FILIPPELLI (2022): An overview of the preclinical discovery and development of remdesivir for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Opin Drug Discov* 17, 9-18.

PARRA-LUCARES, A., P. SEGURA, V. ROJAS, C. PUMARINO, G. SAINT-PIERRE, L. TORO (2022): Emergence of SARS-CoV-2 Variants in the World: How Could This Happen?. *Life* 12, 194.

PAYNE, S. (2017): Family Coronaviridae. *Viruses*, 149-158

PECKHAM, H., N. M. DE GRUIJTER, C. RAINE, A. RADZISZEWSKA, C. CIURTIN, L. R. WEDDERBURN, E. C. ROSSER, K. WEBB, C. T. DEAKIN (2020): Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nat. Commun.* 11, 1–10.

PERERA, R. A., C. K. MOK, O. T. TSANG, H. LV, R. L. KO, N. C. WU, M. YUAN, W. S. LEUNG, J. M. CHAN, T. S. CHIK, C. Y. CHOI, K. LEUNG, K. H. CHAN, K. C. CHAN, K. C. LI, J. T. WU, I. A. WILSON, A. S. MONTO, L. L. POON, M. PEIRIS (2020): Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Euro Surveill.* 25, 2000421.

POURKARIM, F., S. POURTAGHI-ANVARIAN, H. REZAEI (2022): Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacol. Res. Perspect.* 10, e00909.

PRINGLE, C. R. (1996): Virus taxonomy 1996—a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch. Virol.* 141, 2251.

RIDDELL, S., S. GOLDIE, A. HILL, D. EAGLES, T. W. DREW (2020): The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virol. J.* 17, 1-7.

ROY, M., N. JACQUE, W. NOVICOFF, E. LI, R. NEGASH, S. J. EVANS (2022): Unlicensed Molnupiravir is an Effective Rescue Treatment Following Failure of Unlicensed GS-441524-like Therapy for Cats with Suspected Feline Infectious Peritonitis. *Pathogens* 11, 1209.

SCHLOTTAU, K., M. RISSMANN, A. GRAAF, J. SCHÖN, J. SEHL, C. WYLEZICH, D. HÖPER, T. C. METTENLEITER, A. BALKEMA-BUSCHMANN, T. HARDER, C. GRUND, D. HOFFMANN, A. BREITHAUPT, M. BEER (2020): SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: An experimental transmission study. *Lancet* 1, 218–225.

SHARUN, K., R. TIWARI, A. A. SAIED, K. DHAMA (2021): SARS-CoV-2 vaccine for domestic and captive animals: An effort to counter COVID-19 pandemic at the human-animal interface. *Vaccine* 39, 7119-7122.

SHI, J., Z. WEN, G. ZHONG, H. YANG, C. WANG, B. HUANG, R. LIU, X. HE, L. SHUAI, Z. SUN, Y. ZHAO, P. LIU, L. LIANG, P. CUI, J. WANG, X. ZHANG Y. GUAN, W. TAN, G. WU, H. CHEN, Z. BU (2020): Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368, 1016–1020.

SHRESTHA, L. B., C. FOSTER, W. RAWLINSON, N. TEDLA, R. A. BULL (2022): Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA. 1 to BA. 5: Implications for immune escape and transmission. *Rev. Med. Virol.* 32, e2381.

SINGH, A. K., A. SINGH, R. SINGH, A. MISRA (2021): Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes Metab. Syndr.: Clin. Res. Rev.* 15, 102329.

SINGH, D., S. V. YI (2021): On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp. Mol. Med.* 53, 537-547.

SIT, T. H., C. J. BRACKMAN, S. M. IP, K. W. TAM, P. Y. LAW, E. M. TO, Y. T. VERONICA, L.D. SIMS, D.N. TSANG, D.K. CHU, R. A. PERERA, L. L. POON, M. PEIRIS (2020): Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* 586, 776–778.

SONG, S., L. MA, D. ZOU, D. TIAN, C. LI, J. ZHU, M. CHEN, A. WANG, Y. MA, M. LI, X. TENG, Y. CUI, G. DUAN, M. ZHANG, T. JIN, C. SHI, Z. DU, Y. ZHANG, C. LIU, R. LI, Y. BAO (2020): The global landscape of SARS-CoV-2 genomes, variants, and haplotypes in 2019nCoV-R. *Genom. Proteom. Bioinform.* 18, 749-759.

STALL, N.M., W. WU, L. LAPOINTE-SHAW, D. N. FISMAN, V. GIANNAKEAS, M. P. HILLMER, P. A. ROCHON (2020): Sex-specific differences in COVID-19 testing, cases and outcomes: A population-wide study in Ontario, Canada. *J. Am. Geriatr. Soc.* 68, 2188–2191.

STEVANOVIC, V., T. VILIBIC-CAVLEK, I. TABAIN, I. BENVIN, S. KOVAC, Z. HRUSKAR, M. MAURIC, L. MILASINCIC, L. ANTOLASIC, A. SKRINJARIC, V. STARESINA, L. BARBIC (2021a): Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. *Transbound. Emerg. Dis.*, 68, 1767-1773.

STEVANOVIC, V., I. TABAIN, T. VILIBIC-CAVLEK, M. MAURIC MALJKOVIC, I. BENVIN, Z. HRUSKAR, S. KOVAC, I. SMIT, G. MILETIC, S. HADINA, V. STARESINA, L. RADIN, V. PLICHTA, B. SKRLIN, Z. VRBANAC, M. BRKLJACIC, M. CVETNIC, J. HABUS, K. MARTINKOVIC, I. ZECEVIC, G. JURKIC, I. FERENCAK, Z. STRITOF, M. PERHARIC, L. BUCIC L. BARBIC (2021b): The Emergence of SARS-CoV-2 within the Dog Population in Croatia: Host Factors and Clinical Outcome. *Viruses* 13, 1430.

SURYAWANSHI, R. K., I. P. CHEN, T. MA, A. M. SYED, N. BRAZER, P. SALDHI, C. R. SIMONEAU, A. CILING, M. M. KHALID, B. SREEKUMAR, P.Y. CHEN (2022): Limited cross-variant immunity from SARS-CoV-2 Omicron without vaccination. *Nature* 607, 351-355.

TABYNOV, K., M. ORYNBASSAR, L. YELCHIBAYEVA, N. TUREBEKOV, T. YERUBAYEV, N. MATIKHAN, T. YESPOLOV, N. PETROVSKY, K. TABYNOV (2022): A Spike protein-based subunit SARS-CoV-2 vaccine for pets: safety, immunogenicity, and protective efficacy in juvenile cats. *Front. Vet. Sci.* 9, 815978

VILIBIC-CAVLEK, T., V. STEVANOVIC, M. ILIC, L. BARBIC, K. CAPAK, I. TABAIN, J.L. KRLEZA, T. FERENC, Z. HRUSKAR, R.Z. TOPIC, V. KALITERNA, A. ANTOLOVIC-POZGAIN, J. KUCINAR, I. KOSCAK, D. MAYER, M. SVIBEN, L. ANTOLASIC, L. MILASINCIC, L. BUCIC, I. FERENCAK, B. KAIC (2021a): SARS-CoV-2 Seroprevalence and Neutralizing Antibody Response after the First and Second COVID-19 Pandemic Wave in Croatia. *Pathogens*, 10, 774.

VILIBIC-CAVLEK, T., V. STEVANOVIC, D. BRLEK-GORSKI, I. FERENCAK, T. FERENC, M. UJEVIC-BOSNJAK, I. TABAIN, N. JANEV-HOLCER, I. PERKOVIC, M. ANTICEVIC, B. BEKAVAC, B. KAIC, A. MRZLJAK, M. GANJTO, L. ZMAK, M. MAURIC MALJKOVIC, P. JELICIC, L. BUCIC, L. BARBIC (2021b): Emerging Trends in the Epidemiology of COVID-19: The Croatian 'One Health' Perspective. *Viruses* 13, 2354.

VUONG, W., M. B. KHAN, C. FISCHER, E. ARUTYUNOVA, T. LAMER, J. SHIELDS, H. A. SAFFRAN, R. T. MCKAY, M. J. VAN BELKUM, M. A. JOYCE, H. S. YOUNG, D. L. TYRRELL, J. C. VEDERAS, M. J. LEMIEUX (2020): Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat. Commun.* 11, 1-8.

WANG, M. Y., R. ZHAO, L. J. GAO, X. F. GAO, D. P. WANG, J. M. CAO (2020): SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 587269.

WALKER, P. J., S. G. SIDDELL, E. J. LEFKOWITZ, A. R. MUSHEGIAN, D. M. DEMPSEY, B. E. DUTILH, B. HARRACH, R. L. HARRISON, R. C. HENDRICKSON, S. JUNGLEN, N. J. KNOWLES, A. M. KROPINSKI, M. KRUPOVIC, J. H. KUHN, M. NIBERT, L. RUBINO, S. SABANADZOVIC, P. SIMMONDS, A. VARSANI, F. M. ZERBINI, A. J. DAVISON (2019): Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch. Virol.* 164, 2417-2429.

WILLIAMSON, B. N., F. FELDMANN, B. SCHWARZ, K. MEADE-WHITE, D. P. PORTER, J. SCHULZ, N. VAN DOREMALEN, I. LEIGHTON, C. K. YINDA, L. PEREZ-PEREZ, A. OKUMURA, J. LOVAGLIO, P. W. HANLEY, G. SATURDAY, C. M. BOSIO, S. ANZICK, K. BARBIAN, T. CIHLAR, C. MARTENS, D. P. SCOTT, V. J. MUNSTER, E. DE WIT (2020): Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature* 585, 273-276.

YANG H. C., C. CHEN, J. H. WANG, H. C. LIAO, C. T. YANG, C. W. CHEN, Y. C. LIN, C. H. KAO, J. C. LIAO (2020): Genomic, geographic and temporal distributions of SARS-CoV-2 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 30679-30686

YEN, H. L., T. H. SIT, C. J. BRACKMAN, S. S. CHUK, H. GU, K. W. TAM, Y. T. PIERRA, G. M. LEUNG, M. PEIRIS, L. M. POON, HKU-SPH STUDY TEAM (2022): Transmission of

SARS-CoV-2 delta variant (AY. 127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. *Lancet* 399, 1070-1078.

ZHANG, G., B. LI, D. YOO, T. QIN, X. ZHANG, Y. JIA, S. CUI (2021): Animal coronaviruses and SARS-CoV-2. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 1097-1110.

ZHOU, Z., Y. QIU, X. GE (2021): The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Animal Diseases* 1, 1-28.

ZHU, L., H. CHEN, Z. CAI (2022): Zoonotic attack: An underestimated threat of SARS-CoV-2?. *Innovation* 3, 100242.

8. SAŽETAK

Naslov: Epizootiološki čimbenici rizika i klinička slika infekcije SARS-CoV-2 virusom u pasa i mačaka

Ime i prezime studenta: Gorana Miletić

SARS-CoV-2 novi je koronavirus koji se od svoje pojave 2019. godine u Wuhanu, Kini proširio diljem svijeta i značajno utjecao na zdravlje ljudi ali i životinja. Virus u ljudi uzrokuje bolest nazvanu COVID-19, najčešće karakteriziranu respiratornim i probavnim simptomima, a kod nekih ljudi i dugotrajnim posljedicama. Osim u ljudi pojava određene kliničke slike zabilježena je i u nekih vrsta životinja. Kod vidrica na farmama, divljih životinja iz zooških vrtova i određenih vrsta kućnih ljubimaca dokazana je infekcija virusom i pojava kliničkih simptoma.

U ovom istraživanju dokazivala se infekcija pasa i mačaka virusom SARS-CoV-2 na području Republike Hrvatske. Životinje su pretražene na tri najčešće izolirane varijante u ljudi Alfa, Delta i Omikron. Neutralizacijska protutijela dokazivana su iz uzoraka seruma prikupljenih prilikom prijema životinja na Klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pretraženi su uzorci seruma prikupljeni od siječnja do travnja 2022. godine, pri čemu je prikupljeno 296 uzoraka seruma pasa i 140 uzoraka seruma mačaka. Preduvjet pri odabiru uzoraka bio je da životinje imaju ispunjene anamnestičke podatke i podatke nacionala u medicinskom zapisniku.

Pretragom VN-testa dokazana je seroprevalencija od 21,9% u pasa i 18,6% u mačaka. Životinje su testirane pozitivno na sve tri varijante čime je dokazano da postoji jednaka mogućnost zaraze svakom od navedenih varijanti. Za razliku od ljudi u pasa i mačaka zabilježena je značajna razina križne neutralizacije što upućuje na drugačiji imunski odgovor. Zanimljivo je da dob i spol, koji su kod ljudi i u prošlosti kod životinja naglašeni kao bitni čimbenici, nisu utjecali na prijemljivost životinja na virus. Neovisno o tome dokazano je da se klinička slika nekih životinja može povezati sa infekcijom SARS-CoV-2 virusa. Pri čemu su naizraženiji gastrointestinalni simptomi u pasa i respiratorni simptomi u mačaka. Za bolje razumijevanje patogeneze u životinja ali i njihova utjecaja kao izvora infekcije za druge, potrebno je daljnje istraživanje pojavnosti virusa u istih.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, koronavirus, psi, mačke, životinje, Republika Hrvatska, seroprevalencija, VN-test, varijante, Alfa, Delta, Omikron, klinička slika, gastrointestinalni simptomi, respiratorni simptomi

9. SUMMARY

Title: Epizootiological risk factors and clinical signs of SARS-CoV-2 viral infection in dogs and cats

Name: Gorana Miletić

SARS-CoV-2 is a novel coronavirus that, since its appearance in 2019 in Wuhan, China, has spread throughout the world and significantly affected the health of people and animals. In humans, the virus causes a disease called COVID-19, most often characterized by respiratory and digestive symptoms, and in some people with long-term consequences. In addition to humans, the appearance of a certain clinical signs has also been recorded in some animal species. In minks on farms, wild animals from zoos and certain types of pets, infection with the virus and the appearance of clinical symptoms have been proven.

In this research, the infection of dogs and cats with the SARS-CoV-2 virus in the territory of the Republic of Croatia was tested. The animals were tested for, Alpha, Delta and Omicron, the three most commonly isolated variants in humans. Neutralizing antibodies were detected from serum samples collected during the admission of animals to the Clinics of the Veterinary Faculty of the University of Zagreb. Serum samples were collected from January to April 2022. 296 dog serum samples and 140 cat serum samples were collected. A prerequisite for the selection of samples was that the animals had complete anamnestic and physical examination data in the medical records.

The VN-test showed a seroprevalence of 21.9% in dogs and 18.6% in cats. The animals were tested positive for all three variants and proved that there is an equal possibility of infection with each of the mentioned variants. In contrast to humans, a significant level of cross-neutralization was recorded in dogs and cats, which points to a different immune response. It is interesting that age and sex, which have been emphasized as important factors in humans and in the past in animals, did not affect the susceptibility of animals to the virus. Regardless of this, it has been proven that the clinical signs of some animals can be associated with SARS-CoV-2 virus infection. Gastrointestinal symptoms are more pronounced in dogs and respiratory symptoms in cats. For a better understanding of the pathogenesis in animals as well as their influence as a source of infection for others, further research into the occurrence of viruse in them is necessary.

Key words: SARS-CoV-2, coronavirus, dogs, cats, animals, Republic of Croatia, seroprevalence, VN-test, variants, Alpha, Delta, Omicron, clinical signs, gastrointestinal symptoms, respiratory symptoms

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18.07.1996. u Prijedoru. Sa roditeljima selim u Zagreb u četvrtoj godini života te tu upisujem "OŠ Kralja Tomislava". Daljnje obrazovanje nastavljam u Srednjoj veterinarskoj školi u Zagrebu. Tijekom školovanja slobodno vrijeme provodim volontirajući u konjičkom klubu "Appaloosa" gdje učim puno o radu s konjima. 2015. godine upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Znanje i vještine upotpunjavam volontiranjem u privatnoj ambulanti "Šegota", radom na govedarskoj farmi "Vrana", te volontiranjem na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta u razdoblju od 2020. do 2022. godine. Za vrijeme rada na farmi stječem znanje i vještine potrebne u radu sa velikim životinjama. Na klinici za zarazne bolesti stječem znanje o njezi i brizi oko kritično bolesnih infektivnih pacijenata. Svoj interes prema zaraznim bolestima nastavljam priključenjem projektu koji se bavi utjecajem SARS-CoV-2 na kućne ljubimce, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. V. Stevanovića. Za vrijeme sudjelovanja od 2020. do 2022. godine stječem veliku količinu znanja o serološkim metodama pretraživanja uzoraka, prije svega ELISA i VN- test, te o samoj izradi istraživačkog rada. Obaveznu veterinarsku praksu odrađujem u, već mi poznatoj, veterinarskoj ambulanti za male životinje i kućne ljubimce "Šegota".