

Učestalost, čimbenici rizika i klinički značaj infekcije pasa bocavirusom

Šavorić, Juraj

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:178:197285>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Juraj Šavorić

**UČESTALOST, ČIMBENICI RIZIKA I KLINIČKI ZNAČAJ
INFEKCIJE PASA BOCAVIRUSOM**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2018.

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

Predstojnik: Zoran Milas

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

ZAHVALA

Za uspješnu izradu ovog diplomskog rada zahvaljujem se djelatnicima virusološkog laboratorija Zavoda za zarazne bolesti s klinikom, Sveučilišta u Zagrebu, na čelu s doc.dr.sc Vladimirom Stevanovićem, bez kojeg ovaj rad nebi bio niti započet. Zahvaljujem im se na danom znanju i mogućnosti vlastite provedbe metoda molekularne dijagnostike, od same izolacije DNK do očitavanja rezultata. Zasluge za statističku obradu podataka pripadaju doc.dr.sc Maji Maurić.

Da nije bilo bezuvjetne podrške, bilo financijske, bilo emotivne, od strane moje obitelji, siguran sam da ovaj studij ne bih priveo kraju. Također, hvala kolegama na podršci, koji su kroz ove godine postali moji veliki prijatelji.

Za znanje i vještine stečene na klinici zahvaljujem se svim djelatnicima klinike.

POPIS KRATICA

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

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

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

VP = strukturalni kapsidni protein

NS = nestrukturalni protein

NP = nestrukturalni protein jedinstven bocavirusima

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

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

RNK = ribonukleinska kiselina

BVP = (*eng. bovine parvovirus*) parvovirus goveda

CBoV1-3 = (*eng. canine bocavirus 1-3*) pseći bocavirus 1-3

ICTV = (*eng. International Committee on Taxonomy of Viruses*) međunarodni odbor za taksonomiju virusa)

NCBI = (*eng. National Center for Biotechnology Information*) međunarodni centar za razmjenu biotehnoških informacija

WRCC (*eng. Walter-Reed canine cells*) Walter-Reed pseće stanice

MDCK (*eng. Madin-Darby canine kidney cells*) Madin-Darby pseće stanice bubrega

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

bp = (*eng. base pairs*) parovi baza

EDTA = (etilendiamintetraoctena kiselina)

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

RNK-aza = ribonukelaza

DNK-aza = deoksirbonukelaza

TAE = tris acetat etilendiamintetraoctena kiselina

ANOVA = analiza varijance

SAD = Sjedinjene Američke Države

RH = Republika Hrvatska

Popis slika, tablica i grafikona

Slike:

Slika 1. Shematski prikaz i presjek površine kapside bocavirusa

Slika 2. Položaji otvorenih okvira čitanja u genomu CMV i BVP.

Slika 3. Očitavanje rezultata PCR metode elektroforezom u gelu.

Slika 4. Izmjene u aminokiselinskom slijedu VP2 proteina.

Slika 5. Filogenetsko stablo CMV sojeva.

Slika 6. Filogenetsko stablo CMV sojeva s područja RH.

Slika 7. Izmjene u aminokiselinskom slijedu NS1 proteina CMV sojeva.

Slika 8. Izmjene u nukleotidnom slijedu NP1 gena CMV sojeva.

Slika 9. Matriks Z vrijednosti pojedinih parova nukleotidnih slijedova NS1 gena CMV izolata.

Tablice:

Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje odsječaka genoma MVC koji kodiraju proteine VP1 i VP2.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje odsječaka genoma koji kodiraju NS1, NS2 i NP1 virusni protein.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Tablica 5. Stupanj sličnosti nukleotidnih slijedova i aminokiselinskog sastava virusnih gena CMV sojeva iz ovog istraživanja.

Grafikoni:

Grafikon 1. Prevalencija infekcije s CMV u uzorcima razvrstanim prema godini uzorkovanja.

Grafikon 2. Dokazana infekcija CMV u pasa razvrstanih po dobnim kategorijama.

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	6
2.5. Proširenost	6
2.6. Epizootiologija.....	7
2.7. Patogeneza	7
2.8. Klinička slika.....	8
2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz.....	9
2.10. Dijagnostika	9
2.11. Liječenje.....	10
2.12. Imunoprofilaksa	10
2.13. Javno zdravstvo.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Uzorkovanje.....	11
3.2 Molekularna metoda dokaza uzročnika	11
3.2.1. Priprema uzoraka.....	11
3.2.2. Izdvajanje virusne DNK.....	12

3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....	12
3.2.4. Elektroforeza u gelu.....	15
3.2.4.1. Priprema TAE pufera.....	16
3.2.4.2. Pripremanje gela.....	17
3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze.....	17
3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a	18
3.4. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Učestalost.....	20
4.2. Čimbenici rizika i klinički značaj.....	21
4.3 Analiza genoma CMV.....	23
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČCI.....	33
7. LITERATURA	34
8. SAŽETAK.....	39
9. SUMMARY.....	40
10. ŽIVOTOPIS.....	41

1. UVOD

Minutni virus pasa (engl. Canine minute virus – CMV) je virusni patogen pasa prvi puta opisan polovicom prošlog stoljeća (BINN i sur., 1970.). Iako je prošlo 50 godina od otkrića ovog virusa do danas nije razjašnjeno pitanje njegove patogenosti (CARMICHAEL i sur., 1991.; CARMICHAEL i sur., 1993.; SHAN i sur., 2010.). Osnovno pitanje koje se postavlja je njegov klinički značaj u terenskim uvjetima te da li se radi o primarnom patogenu pasa ili oportunističkoj infekciji. U pokusnim infekcijama CMV izazivao je poremetnje u reprodukciji te respiratorne infekcije u štenaca u prvim danima života (CARMICHAEL i sur., 1993.; CARMICHAEL i sur., 1994.). Navedeni podaci se razlikuju od kliničke slike koja se opisuje kod infekcija u terenskim uvjetima, a u kojima prevladavaju proljev i povraćanje kao znakovi infekcije probavnog sustava što dodatno otežava određivanje kliničkog značaja CMV.

Veliki problem je i vrlo ograničeni broj radova koji bi opisivali infekciju CMV. Većina dostupnih podataka potječe iz zadnjih desetak godina kada je ovaj uzročnik dobio novi značaj nakon 2005. godine kada je u djece sa znakovima oboljenja dišnog sustava izoliran virus srodan CMV (ALLANDER i sur., 2005.). Minutni virus pasa zajedno sa srodnim patogenima drugih vrsta životinja i čovjeka svrstan je u novi rod *Bocavirus*. Pripadnici ovog roda imaju jedinstvenu građu genoma i virusne čestice koja ih razlikuje od drugih pripadnika porodice *Parvoviridae*. Bocavirusi su jedinstveni među ostalim članovima porodice *Parvoviridae* jer sadrže treći otvoreni okvir čitanja koji kodira protein NP1 (KAPOOR i sur., 2010.). Zadnjih nekoliko godina posebna pažnja se pridaje ulozi NP1 i NS1 nestrukturnih proteina kao čimbenika virulencije bocavirusa općenito, međutim rezultata je još nedovoljno za konačni zaključak.

Cilj ovog rada bio je istražiti prisutnost CMV u populaciji pasa na području Rpublike Hrvatske (RH) te prevalenciju infekcije. Isto tako pokušao se odrediti klinički značaj te čimbenike rizika koji utječu na epizootiologiju CMV infekciju u terenskim uvjetima. Određivanjem slijeda nukleotida i odgovarajućeg aminokiselinskog sastava virusnih proteina cilj je bio dobiti uvid u evoluciju uzročnika i epizootiologiju bolesti na molekularnoj razini te ustanoviti da li bi CMV mogao poslužiti kao model za bocavirusne infekcije u drugih vrsta životinja i ljudi.

2.PREGLED LITERATURE

2.1. Povijest

Minutni virus pasa (engl. Canine Minute Virus – CMV) ili pseći parvovirus – 1 (engl. Canine Parvovirus – 1 – CPV-1) prvi puta je izdvojen iz izmeta njemačkog ovčara u vojnoj bazi u Njemačkoj 1967. godine (BINN i sur., 1970.). Iako je zbog veličine, građe virusne čestice te bioloških svojstava svrstan u rod Parvovirus antigenska svojsva i razlika u sposobnosti hemaglutinacije jasno razlikuju ovaj virus od psećeg parvovirusa 2 (engl. Canine Parvovirus-2 – CPV-2) (CARMICHAEL i sur., 1994.). Naknadnim određivanjem strukture genoma ustanovljeno je da je ovaj virus najsirodniji s goveđim parvovirusom – 1 (engl. Bovine Parvovirus -1 – BPV-1) (SCHWARTZ i sur., 2002.).

Analiza genoma novootkrivenog virusnog uzročnika respiratornog sindroma u djece 2005. godine pokazala je najveću srodnost uzročnika s CMV i BPV te je iste godine oformljen novi rod *Bocavirus* (naziv je dobiven od početnih slova engleskih naziva životinjskih vrsta u kojih je ova skupina virusa prvi puta opisana: Bovine za goveda i canine za pse) unutar porodice *Parvoviridae* (ALLANDER i sur., 2005.). Iako su bocavirusi u goveda i pasa opisani još šesdesetih godina prošlog stoljeća, tek je otkriće humanog bocavirusa intenziviralo istraživanja pripadnika ovog roda. Danas se zna da postoje još tri vrste psećih bocavirusa, pseći bocavirus 1, 2 i 3 (eng. canine bocavirus CBoV1, CBoV 2, CBoV3) ali i bocavirusi drugih životinja (KAPOOR i sur., 2012.; BODEWES i sur., 2014.).

2.2. Etiologija

2.2.1. Građa virusne čestice

Pripadnici roda *Bocavirus* su mali virusi koji sadržavaju jednolančanu DNK te su sposobni samostalno se umnažati. Virusna kapsida je ikozaedralne simetrije i ne sadrži ovojnicu (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.). Veličina virusne čestice iznosi 20-21 nm (BINN i sur., 1970).

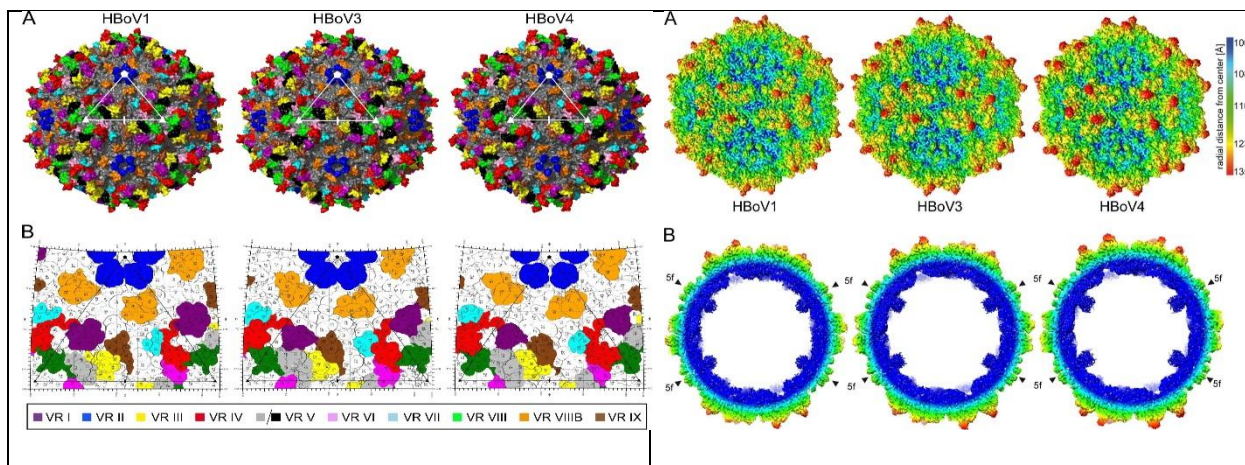
Kapsida bocavirusa svojim značajkama odgovara kapsidi ostalih pripadnika porodice *Parvoviridae* i smatra se da je kao i u ostalih parvovirusa odgovorna za prepoznavanje staničnih receptora domaćina, antigenska svojstva virusa te sklapanje zrele virusne čestice (HALDER i sur., 2012.; MIETZSCH i sur., 2017.). Kapsida je sastavljena od tri strukturna virusna proteina VP1, VP2 i VP3, u odnosu 1:1:10 (ZOU i sur. 2016.; QIU i sur., 2017.). Enzimatskim cijepanjem VP2 u domaćinu nastaje VP3 protein, dok VP1 protein sadrži dodatnu N-terminalnu regiju nadodanu na cijeli aminokiselinski slijed VP2 proteina koja ima enzimatsku aktivnost fosfolipaze A2 (ZÁDORI i sur., 2001.; MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.). Nestrukturni protein VP1 zaslужan je za aktivaciju fosfolipaze A2, stoga je neophodan za ulazak virusa u jezgru prilikom infekcije i prolaz kroz endosomalnu membranu. (SUN i sur., 2009.).

Reljef kapside bocavirusa pokazuje sve značajke kapside ostalih parvovirusa: velike izdanke nalik šiljcima na trostrukim osima simetrije, mala udubljenja na dvostrukim osima simetrije, cilindrične, manje, izdanke na petostrukim osima simetrije okružene širim udubljenjima nalik kanjonima (MIETZSCH i sur., 2017.). Za razliku od svih ostalih parvovirusa, kanal koji prolazi kroz cilindrične structure na peterostrukim osima simetrije prolazi cijelom duljinom strukture i ulazi u unutrašnjost kapside (KAILASAN i sur., 2015.; MIETZSCH i sur., 2017.).

Struktura VP3 bocavirusa ima topologiju koja odgovara ostalim parvovirusima uključujući beta A lanac, zatim beta ploču sastavljenu od osam beta lanaca, alfa uzvojnica i četiri velike petlje umetnute između beta lanaca (MIETZSCH i sur., 2017.).

Pseći minutni virus ima dva nestrukturna proteina: NS1 i NP1, nalik BVP (SCHWARTZ i sur, 2002). Uloga NS1 proteina je pomoć u započinanju i održavanju umnažanja virusnog genoma, neophodni su za slaganje virusa i posreduju brojnim i važnim interakcijama između virusne čestice i stanice domaćina (FASINA i sur., 2017.).

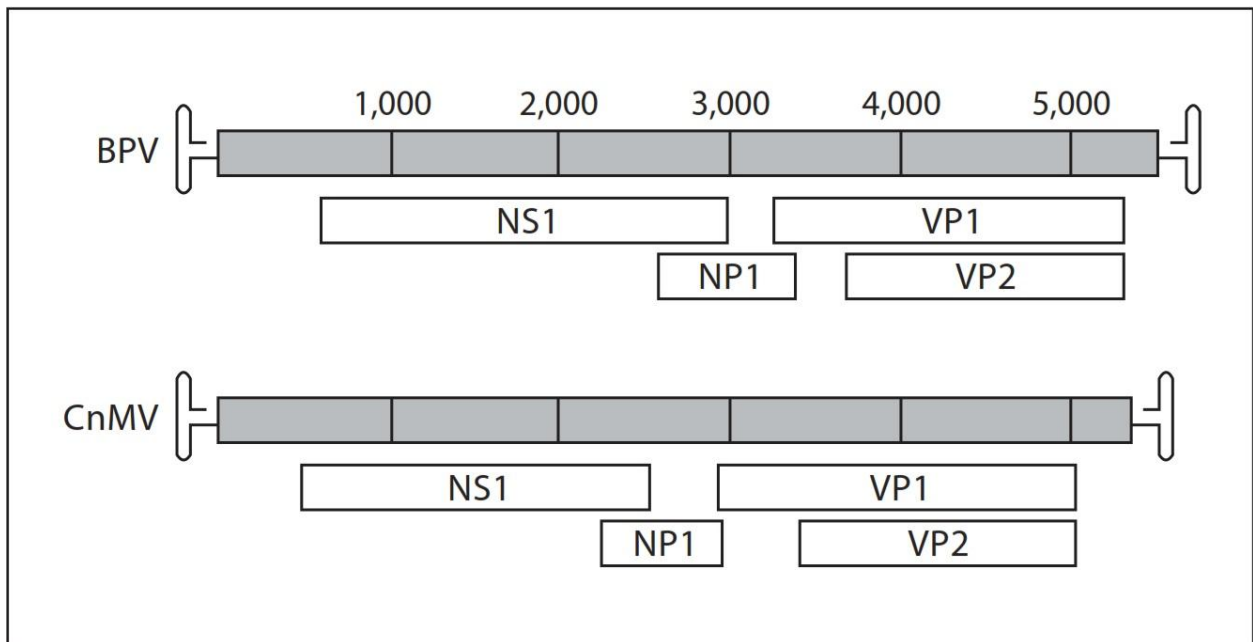
Slika 1. Shematski prikaz i presjek površine kapside *Bocavirusa* (MIETZSCH i sur., 2017.).



2.2.2. Grada genoma

Genom minutnog virusa pasa sastoji se od 5390 nukleotida. (MANTEUFEL i TRUYEN 2008.). Sadrži tri otvorena okvira čitanja. Prvi se nalazi na lijevoj strani, sastoji se od 2325 parova baza i sadrži informaciju o strukturi proteina NS1. U sredini genoma nalazi se bocavirusima jedinstveni okvir čitanja koji iznosi 561 baznih parova i kodira protein NP1 (SCHWARTZ i sur., 2002.). Na desnom kraju genoma nalazi se treći okvir od 2112 parova baza koji kodira protein VP1 i VP2 (SHAN i sur., 2010.).

Slika 2. Položaji otvorenih okvira čitanja u genomu CMV i BVP. (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.).



2.3. Taksonomija i klasifikacija

Parvovirusi se javljaju u različitim životinjskih vrsta, čovjeka i kukaca, te uzrokuju različitu kliničku sliku ovisno o svojim biološkim svojstvima i tropizmu. Pripadaju porodici *Parvoviridae* koja obuhvaća dvije podporodice: podporodicu *Parvovirinae*, koja se odnosi na rodove koji se javljaju u kralježnjaka i podporodicu *Densovirinae* koji se javljaju u kukaca. Kriteriji za taksonomsko razvrstavanje unutar *Parvovirinae* su: virusi unutar istog roda moraju biti monofilektični (posjedovati zajedničkog pretka ili grupu predaka) i kodirati NS1 proteine koji su najmanje 30% slični s ostalima prema aminokiselinskom slijedu, ali manje od 30% slični s onima različitog roda. Virusi unutar vrste moraju kodirati NS1 protein koji posjeduje najmanje 85% sličnosti aminokiselinskog slijeda, a razlikovati se 15% od virusa ostalih vrsta (ICTV, 2017.). Rodovi su razvrstani na temelju molekularnih značajki virusa, te je tako podporodica *Parvovirinae* razvrstana u pet rodova: *Protoparvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* i *Bocavirus* (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Prema izvješću ICTV iz 2013. godine, rod *Bocavirus* preimenuje se u *Bocaparvovirus*. Tako CMV postaje *Carnivore bocaparvovirus 1*, pseći bocavirus 1 postaje *Carnivore bocaparvovirus 2*, mačji bocavirus postaje *Carnivore bocaparvovirus 3*, bocavirus morskih lavova 1 i 2 postaje

Pinniped bocaparvovirus 1 (perajari), a bocavirus morskih lavova 3 postaje *Pinniped bocaparvovirus 3*. Humani bocavirus 1 i 3 zajedno sa bocavirusom gorila postaje *Primate bocaparvovirus 1*, a sojevi humanog bocavirusa 2 i 4 preimenuju se u *Primate bocaparvovirus 2*. Goveđi i svinjski sojevi bocavirusa preimenovani su u *Ungulate bocaparvovirus 1-5* (papkari) (ICTV, virus taxonomy 2013).

2.4. Tenacitet

Minutni virus pasa je otporan na kloroform, eter i kiseline. Temperatura od iznad 60°C tijekom 1 sata ga ne inaktivira. (BINN i sur., 1970.). Smatra se da zbog svoje sličnosti s parvovirusima dugo preživljavaju u okolišu.

2.5. Proširenost

Ne postoju puno dostupnih podataka o proširenosti infekcije CMV u svijetu. Rezultati seroloških istraživanja prisutnosti minutnog virusa pasa kao i ostalih bocavirusa u pasa ukazuju na zaključak da su bocavirusi široko rasprostranjeni unutar pseće populacije s seroprevalencijom približnom 50-70% diljem svijeta, ali se seroprevalencija razlikuje ovisno o državi (SHAN i sur., 2010.).

Prevalencija serološki pozitivnih pasa (titar protutijela > 1:40) u SAD-u iznosi 47% (CARMICHAEL i sur., 1993.). Virus je dokazan u Japanu (MOCHIZUKI i sur., 2002.) i u Kini (SHAN i sur., 2010.). Dvije godine kasnije, u SAD-u otkrivene su nove vrste psećih bocavirusa (KAPOOR i sur., 2012.), kao i u Hong Kongu, uz dodatno otkriće mačjeg bocavirusa (LAU i sur., 2012.). Ostali pripadnici psećih bocavirusa dokazani su u Južnoj Koreji 2015. godine (CHOI i sur., 2015.), a godinu kasnije i u Kini (GUO i sur., 2016.). Na području Europe, CMV prvi puta je izoliran iz uzoraka uginule štendi u Italiji (DECARO i sur., 2012.), a CBoV2 dokazan je u pasa u Njemačkoj, zatim u mačaka i vukova u Portugalu. (BODEWES i sur., 2014.; FEI NG i sur., 2014.; CONCEIÇÃO-NETO i sur., 2017.).

2.6. Epizootiologija

Infekcija CMV je virusna zarazna bolest pasa koja se klinički očituje enteritisom s proljevom i/ili respiratornom bolešću s otežanim disanjem. (SUN i sur., 2009.). Većina podataka o epizootiologiji bolesti nedostaje, a dostupni podaci najčešće su dobiveni nakon pokusnih infekcija. Fetusi i štenad inficiraju se transplacentarno ili horizontalno, oronazalnim putem (MOCHIZUKI i sur., 2002). Do sada, virus je izoliran iz rektalnih i nosnih briseva, urina i bubrežnog tkiva. Za infekciju bocavirusima pasa u prirodnim uvjetima primljivi su domaći psi, vukovi i mačke. (LAU i sur., 2012.; CONCEIÇÃO-NETO i sur., 2017.) Klinički oboli štenad mlađa od 3 mjeseca i štenad u prvim tjednima života sa znakovima enteritisa i/ili respiratorne bolesti s otežanim disanjem, dok se u starijih pasa može očitovati enteritisom različitog stupnja, no najčešće prolazi bez kliničkih znakova (SUN i sur., 2009.).

2.7. Patogeneza

Patogeni potencijal CMV nije u potpunosti razjašnjen. Predpostavlja se da imunosupresija zbog značajne redukcije monocitne fagocitoze ima ulogu u patogenezi i vjerojatno djeluje kao predisponirajući čimbenik za razvoj koinfekcija. Viremija traje od prvog do trećeg dana poslije infekcije. Sekundarno umnažanje virusa odvija se u stanicama s visokom mitotičkom aktivnošću. Ciljni organi su pluća, tanko crijevo i limfoidno tkivo (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.).

2.8. Klinička slika

Nakon pokusne infekcije gravidnih kuja CMV infekcija, ovisno o fazi graviditeta, može se očitovati kao embrionalna smrtnost i resorpcija plodova, pobačaj, porod abnormalnih plodova i rođenje avitalne štenadi. Infekcije do tridesetog dana gestacije dovode do uginuća embrija i resorpcije, dok se u kasnijoj fazi mogu javiti neki od gore navedenih znakova. Neonatalna smrtnost je najviša tijekom prvih 4 tjedna starosti štenadi. Pokusno inficirana štenad pokazuje znakove apatije, anoreksije, respiratornog distresa zbog intersticijske pneumonije i/ili znakove enteritisa. Stariji psi najčešće obole supklinički ili imaju blagi proljev (MANTEUFEL i sur., 2008.). Od znakova respiratornog distresa prevladava ubrzano i plitko disanje (CARMICHAEL i sur., 1994.).

Analizom uzoraka, 2012. godine, uzetih od pasa u svrhu proučavanja virusne flore respiratornog sustava, otkrivena je prva nova vrsta bocavirusa pasa nazvana *Canine bocavirus 1* (CBoV1). Filogenetskom analizom pozitivnih uzoraka CBoV1 podjeljen je u tri podtipa CBoV-A, CBoV-B i CBoV-C. CBoV-A pokazao je statistički značajnu prevalenciju u uzorcima uzetih iz pasa bez kliničkih znakova, dok su podtipovi CBoV-B i CBoV-C bili više prisutni kod pasa sa respiratornim kliničkim znakovima. (KAPOOR i sur., 2012.). Godinu kasnije, sumnja na bolest zarazne etiologije postavljena je za psa oboljelog od teškog hemoragičnog gastroenteritisa, nekrotizirajućeg vaskulitisa, granulomatoznog limfadenitisa i anuričnog zatajenja bubrega. Temeljitom virusološkom i bakteriološkom pretragom isključene su bolesti poput parvoviroze, štenećaka, koronavirusnog enteritisa pasa, salmoneloze, kampilobakterioze i klostiridioze, dok je parazitološka pretraga na *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp. bila negativna. Molekularnom dijagnostikom, iz jetre izoliran je novi tip bocavirusa pasa, nazvan *Canine bocavirus 3* (LI i sur., 2013.).

2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz

Nakon pokusne infekcije u štenadi, makroskopski mogu se uočiti atelektaze kardijačnih i apikalnih lobusa pluća. Četvrti dan nakon infekcije, pluća štenadi inficirane CMV pokazuju veća područja sivo-crvene konsolidacije uz povećanje medijastinalnih i bronhialnih limfnih čvorova. Mikroskopski je uočena infiltracija upalnih stanica, pretežito neutrofila u Payerovim pločama i vilima sluznice tankog crijeva. U plućima se u najranijoj fazi bolesti može pronaći zadebljanje alveolarne stijenke zbog stanične infiltracije i fokalne nekroze bronhialnih epitelnih stanica. Pojedine bronhialne epitelne stanice sadrže bazofilne uklopine, a prisutna je i neutrofilna infiltracija. Glavno patološko obilježje inficirane štenadi upućuje na intersticijsku pneumoniju različitog stupnja, sa eksudativnim bronhitisom i bronhiolitisom (CARMICHAEL i sur., 1994.). Timus, slezena i limfni čvorovi pokazuju znakove upale odnosno edem, nekrozu i infiltraciju upalnim stanicama. Nakon pokusne infekcije, virus se može izolirati u visokom titru iz timusa, slezene, ileuma i limfnih čvorova. Duodenum i jejunum su najčešće pokazuju hiperplaziju epitelnih stanica i nekrozu pajerovih ploča. Za razliku od infekcije s CPV-2, kripote pri infekciji bocavirusom pasa ostaju intaktne, osim pojedinačnih nekrotičnih stanica (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.).

2.10 Dijagnostika

U slučaju neonatalne smrtnosti, dijagnoza CMV infekcije može se potvrditi izolacijom virusa, lančanom reakcijom polimeraze, imunoflorescencijom i hemaglutinacijom. Virus se može umnožavati u Walter Reed psećim stanicama (eng. Walter Reed canine cells - WRCC) i u Madin-Darby psećim bubrežnim stanicama (eng. Madin-Darby canine kidney cells - MDCK). Neizravna hemaglutinacija i neizravna imunoflorescencija smatraju se zlatnim standardom u dijagnostici odnosno u dokazu protutijela. Titar protutijela $\geq 1:40$ smatra se serološki pozitivnim (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.).

2.11. Liječenje

Liječenje se svodi na simptomatsku i potpurnu terapiju, kao i kod ostalih gastroenteritisa. Osnovni cilj liječenja je nadoknada tekućine, uspostavljanje ravnoteže elektrolita i suzbijanje sekundarnih bakterijskih infekcija. Nadoknada tekućine je jedan od najvažnijih aspekata kliničkog liječenja i treba se davati kontinuirano dok traju proljev i povraćanje. Antimikrobni pripravci se primjenjuju kako bi spriječili širenje bakterija u krv koji dovodi posljedično do sepse. Osim navedenog, koriste se antiemetici i lijekovi za zaštitu sluznice želuca kao na primjer antagonisti H-2 receptora odnosno ranitidin, cimetidin i famotidin (GREEN i DECARO, 2011.).

2.12. Imunoprofilaksa

Trenutačno ne postoje dostupni podaci o provedbi imunoprofilakse.

2.13. Javno zdravstvo

Iz dostupne literature nije opisan prijenos psećih bocavirusa na čovjeka i obrnuto, te samim time nema značaj po pitanju javnog zdravstva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

Za potrebe ovog istraživanja u razdoblju od 1. lipnja 2015. do 10. listopada 2017. godine sakupljeno je i obrađeno 1042 uzorka, od toga 573 obrisaka rektuma pasa s kliničkim znakovima akutnog gastroenteritisa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te veterinarskih organizacija s područja grada Zagreba, 198 obrisaka sluznica vagine i 196 obrisaka sluznice nosa od ukupno 192 kuje i mužjaka sa reproduktivnim poremećajima i 75 obriska rektuma zdrave populacije pasa. Za daljnju statističku obradu od navedenog broja, korišteni su podaci o 288 pasa za koje su bili dostupni podaci iz nacionala, anamneze te kliničkog pregleda i tijeka liječenja.

3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika

Za molekularni dokaz prisutnosti CMV u uzorku korištena je ukupna DNK izdvojena iz uzoraka fecesa, obrisaka rektuma, vagine, nosa i dušnika. Dokazivanje prisustva CMV načinjeno je primjenom lančane reakcije polimerazom umnažajući odsječke genoma virusa koji kodiraju NS1, NS2, NP1, VP1 i VP2 proteine.

3.2.1. Priprema uzoraka

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

3.2.2. Izdvajanje virusne DNK

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

Komplet QIAamp DNA Mini Kit sadržava:

QIAamp kolona za centrifugiranje 50 komada

plastične epruvete zapremine 2 ml 150 komada

puferska otopina AL 12 ml

puferska otopina ATL 10 ml

puferska otopina AW1 (koncentrirana) 19 ml

puferska otopina AW2 (koncentrirana) 13 ml

puferska otopina AE 22 ml

proteinaza K 1,25 ml

3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Izvođenje PCR metode načinjeno je uz korištenje sljedećih reagensa:

- voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- reakcijski pufer 10x koncentriran
- 50 mM MgCl₂
- 25 mM dNTP
- uzvodna početnica 10 μM (CBoV 3506)
- nizvodna početnica 10 μM (CBoV 4793)
- Taq Platinum 5u/μl (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)

Prilikom pretraživanja uzoraka i njihovog statusa, korištene su početnice CBoV 3506 i CBoV 4792. (MOCHIZUKI i sur., 2002.).

Oznaka početnice	Smjer vezanja	Nukleotidni slijed	5-3
CBoV 3506		Uzvodna	početnica
GCGAATTCGTGGTATGCACCTATATACAACGGAC			
CBoV 4792		Nizvodna	početnica
CGGGATCCGGATGCGACATAGGCAGAGTTCCATC			

Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje odsječaka genoma MVC koji kodiraju proteine VP1 i VP2.

Reakcijska smjesa je pripravljena u količini od 25 μ l po uzorku. U PCR Eppendorf epruvetice stavljeno je 22,5 μ l reakcijske smjese, a potom 2,5 μ l izdvojene DNK pojedinog uzorka.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Reagens	Količina za 1 uzorak	Konačna koncentracija
Voda	14,43 μ l	/
Pufer 10x	2,5 μ l	1x
50 mM MgCl ₂	0,75 μ l	1,5 mM
dNTP (10mM)	2,00 μ l	200 μ M
Početnica CBoV 3506 (10 μ l/l)	1,25 μ l	0,5 μ M
Početnica CBoV 4792 (10 μ l/l)	1,25 μ l	0,5 μ M
Taq Platinum 5c/ μ l	0,32 μ l	1,25 U

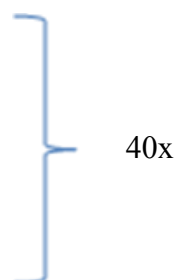
Pripremljeni uzorci stavljeni su u PCR-uređaj programiran za sljedeći temperaturni program:

95 °C 5 min

94 °C 40 s

50 °C 30 s

72 °C 2:20 min



72 °C 7 min

hlađenje pri + 4°C

Ukoliko je pretraženi uzorak bio pozitivan na CMV, radilo se novo umnažanje lančanom reakcijom polimerazom, ali s drugačijim početnicama, kako bi se dobili odsječci genoma koji kodiraju proteine NS1, NS2 i NP1.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje odsječaka genoma koji kodiraju NS1, NS2 i NP1 (SHAN i sur., 2010.).

Oznaka početnice	Smjer vezanja	Nukleotidni slijed 5'→3'
MVCL- 160	Uzvodna	AGACAATATCAAAATGGAGG
MVCR- 1198	Nizvodna	TTAGCCATTGCTTTCTACAG
MVCL- 1117	Uzvodna	TTTGATGCCACAAGTAAGAC
MVCR- 2147	Nizvodna	TTAATGTTCCAAGTACGATG
MVCL- 2027	Uzvodna	TGA AACAACTTGAAAGCACG
MVCR- 3084	Nizvodna	CCATCTACCTCCATTGCAGC

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Reagens	Količina za 1 uzorak
Voda	9,66 μ l
Pufer 10x	2,5 μ l
MgCl ₂	1,0 μ l
dNTP	4,0 μ l
početnica MVCL- 160	2,5 μ l
početnica MVCR- 1198	2,5 μ l
Taq Platinum	0,34 μ l

Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode s ostalim početnicama (MVCL-1117, MVCR-2147, MVCL-2027 i MVCR-3084) je jednak kao u tablici. Reakcijske smjese pripravljene su u količini 25 μ l po uzorku, a u Eppendorf epruvetice stavljeno je 22,5 μ l reakcijske smjese, a potom 2,5 μ l izdvojene DNK pojedinog uzorka. U PCR uređaju početna denaturacija je trajala 5 minuta, pri temperaturi od 94 stupnjeva Celzijusevih. Umnažanje odsječaka radilo se na 45 ciklusa, gdje je demnaturacija trajala 40 sekundi pri 94 °C, vrijeme vezanja početnica trajalo je 40 sekundi pri temperaturi od 50 °C za početnice MVCL-160 do 2147, dok je za početnice MVCL-2027 i MVCR-3084 iznosilo 52 °C. Produljivanje umnoženog odsječka trajalo je dvije minute i 30 sekundi, sa završnim produljivanjem od 10 minuta, na 72 °C. Hlađenje se vršilo pri +4 °C.

3.2.4. Elektroforeza u gelu

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

Pribor, oprema i reagensi:

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

3.2.4.1. Priprema TAE pufera

Reagensi za pripremu 50x koncentriranog TAE pufera:

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

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

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

Prvo se priprema 0,5 M otopina EDTA na način da se 93,5 g EDTA staviti u 400 ml redestilirane vode uz podešavanje pH na 8,0 dodavanjem kristala NaOH i dopuni redestiliranom vodom do volumena od 500 ml. Nakon toga 242 g Tris baze otopi se u 750 ml redestilirane vode te se dodaju 57 ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) nakon čega se dopuni redestiliranom vodom do 1000 ml. Kako je za pripremu gela za elektroforezu potreban TAE pufer koncentracije 1x iz načinjene otopine potrebnu koncentraciju pripremimo miješanjem 10 ml TAE pufera koncentriranog 50x i 490 ml destilirane vode.

3.2.4.2. Pripremanje gela

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

3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze

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

3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a

Nukleotidni slijed umnoženog odsječka virusne DNK određivan je u svrhu molekularne tipizacije i filogenetske analize minutnog virusa pasa na području RH. Slijed nukleotida određen je u tvrtki Macrogen, Amsterdam, Nizozemska pomoću ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, California, SAD) na uređaju 3730 x 1 DNA analyzer istog proizvođača, a korištene su iste početnice kao u opisanom PCR-u. Daljnju analizu DNK slijedova radilo se pomoću računalnog programa MEGA 7 (KUMAR i sur., 2016.). Pomoću navedenog programa načinjeno je višestruko sravnjivanje DNK slijedova i ustanovljavanje postojećih polimorfnih mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka. Koristeći metodu najveće vjerojatnosti (engl. maximum likelihood, ML) nukleotidni slijedovi dobivenih odsječaka virusne DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim slijedovima iz NCBI banke gena za pojedine podtipove CMV u cilju izrade filogenetskog stabla.

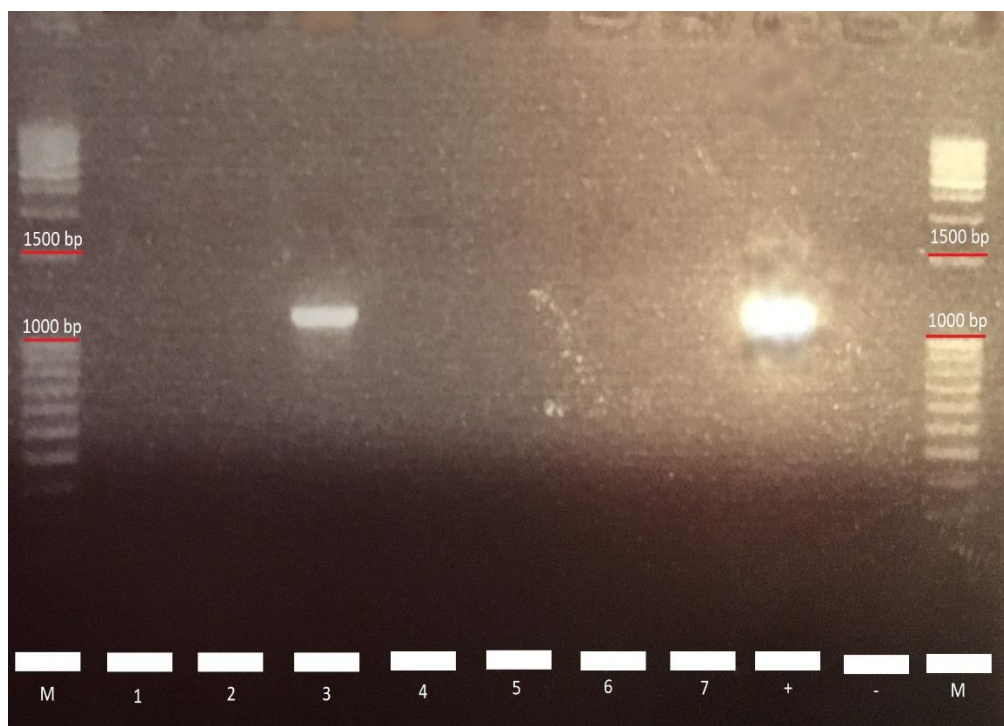
3.4. Statistička obrada podataka

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (data analysis software system), version 12. Software.dell.com (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike načinjena je i statistička analiza rezultata. Kvalitativne varijable i učestalosti obrađene su hi-kvadrat testom.

4. REZULTATI

Uspješan dokaz uzročnika PCR metodom podrazumjeva je prisutnost umnoženog fragmenta veličine 1266 bp na gelu. Dobiveni produkti PCR metode poslani su na pročišćavanje i određivanje nukleotidnog slijeda.

Slika 3. Očitavanje PCR rezultata elektroforezom u gelu.



Produkt PCR reakcije svojim položajem odgovara odsječku genoma od 1266 bp.

OZNAKE

1-7 pretraživani uzorci

+ pozitivna kontrola

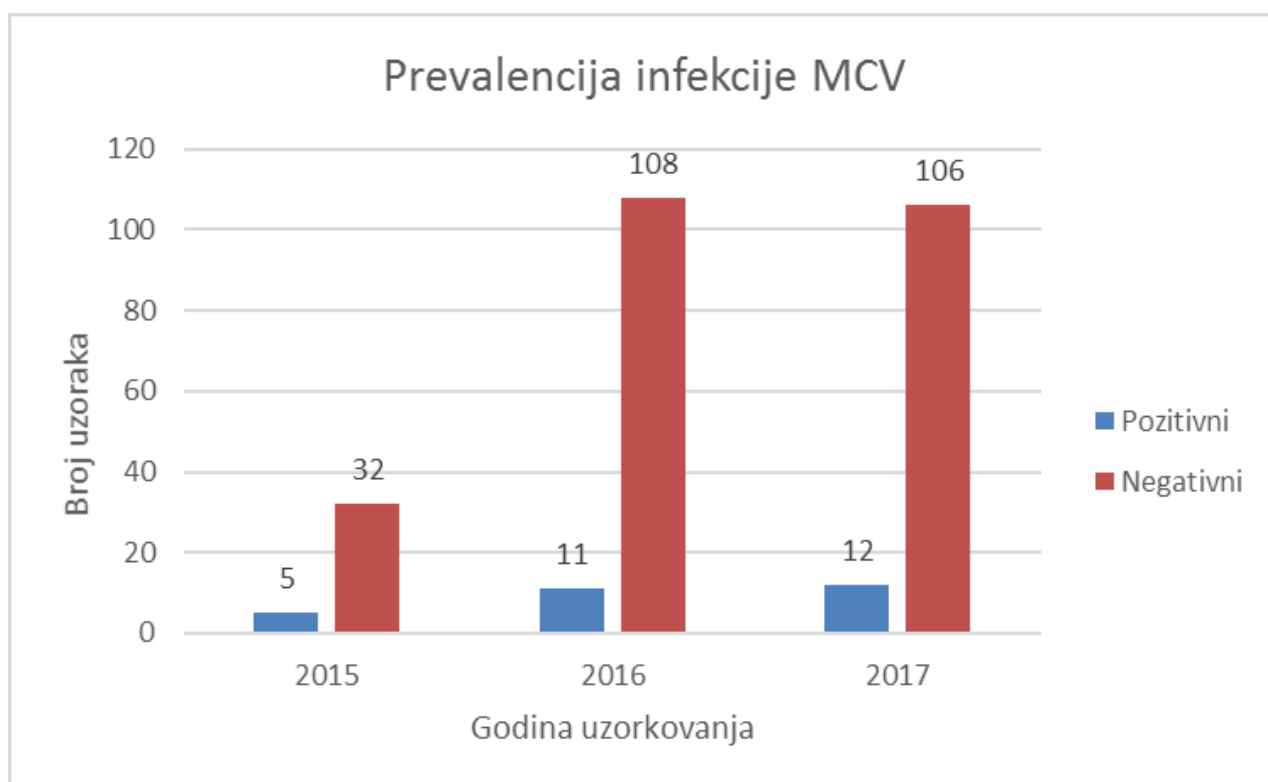
- negativna kontrola

M molekularni biljeg

4.1. Učestalost

Ovim istraživanjem od 1042 uzorka statistički je obrađeno 288 uzoraka uzetih od pasa s znakovima akutnog gastroenteritisa, koji su pretraženi na prisutnost CMV. Za 14 uzoraka nije se mogla izvršiti pretraga. Broj pozitivnih uzoraka bio je 28 (9,72%). U zdravoj populaciji pasa, od ukupno 75 uzetih uzoraka dva uzorka bila su pozitivna na CMV (2,67%). U populaciji pasa s reproduktivnim poremećajima od 120 jedinki, tri su jedinke bile pozitivne na MCV (2,5%).

Grafikon 1. Prevalencija infekcije s CMV u uzorcima razvrstanim prema godini uzorkovanja.

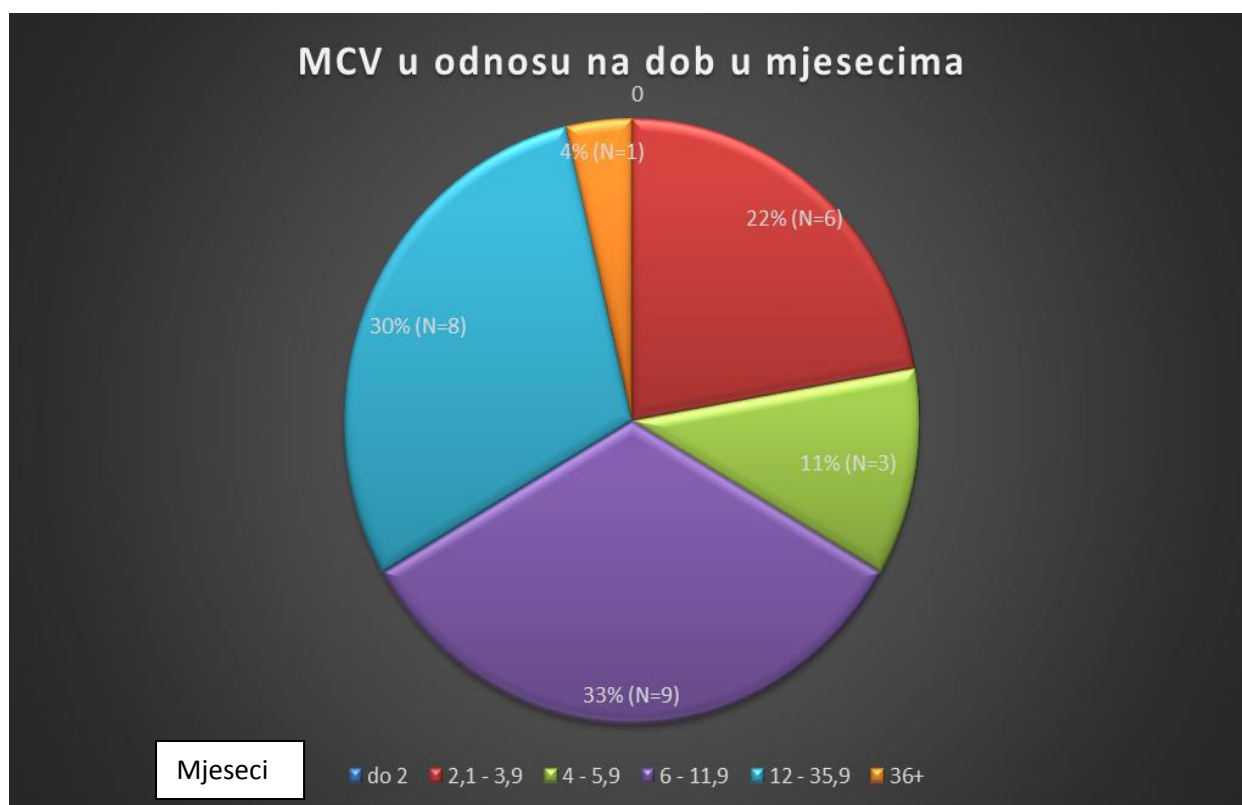


4.2. Čimbenici rizika i klinički značaj

Za detaljniju statističku obradu koristilo se 288 uzoraka uzetih od pasa s kliničkim znakovima akutnog gastroenteritisa. Iz anamnestičkih podataka bilo je vidljivo da je od ovog broja pasa 212 jedinki bilo u posjedu privatnih vlasnika, dok je njih 76 bilo u vlasništvu skloništa za nezbrinute životinje. Navedeni psi mogu se razvrstati u 59 različitih pasmina od kojih je najviše bilo mješanaca (N=136), maltezera (N=20), njemačkih ovčara i američkih staforda (N=11), te labrador retrievera (N=9), dok je u ostalih pasmina zastupljenost bila do sedam jedinki. Pasa u dobi do dva mjeseca obrađeno je 36, između dva i četiri mjeseca 31, a između četiri i šest mjeseci starosti 25. Preostale dobne kategorije činili su psi u starosti od šest mjeseci do godine dana (54), od jedne godine do 3 godine starosti (51) i posljednju psi stariji od tri godine (82). Muškog spola bilo je 153 pasa, a ženskog spola bilo je sveukupno 134. Prilikom prvog pregleda ili u tijeku bolničkog liječenja povraćanje je uočeno u 206, proljev u 240, a krvavi proljev u 124 pasa. U 30 životinja uočeni su klinički znakovi koji govore u prilog oboljenja dišnog sustava.

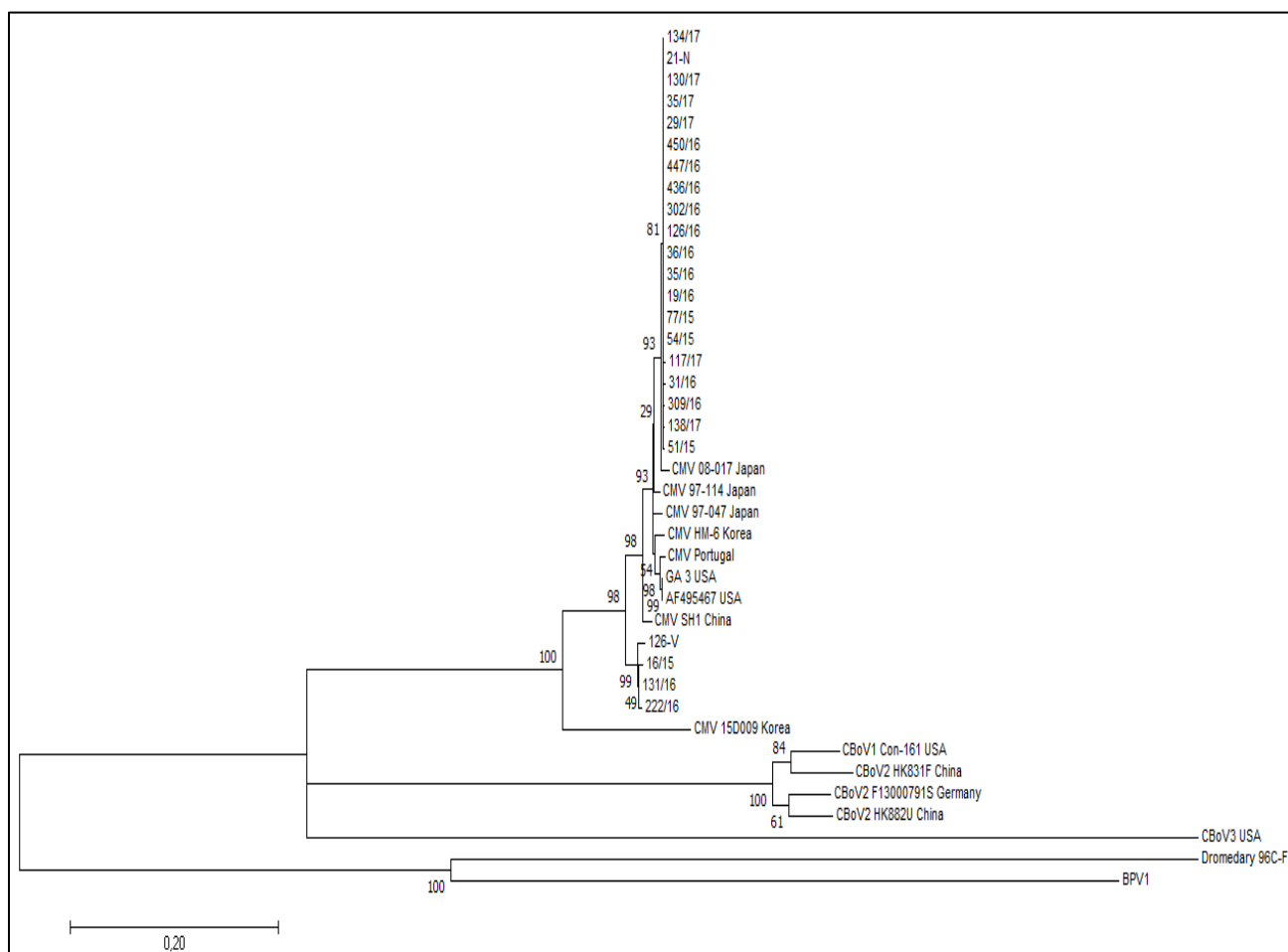
Statistički značajnim pokazala se infekcija pasa CMV u odnosu na podatak ima li određeni pas vlasnika ($p=0,02$). Navedeni podatak govori u prilog tome da su infekciji CMV više skloni psi koji borave u skloništima za životinje odnosno azilima. Usporedbom učestalosti infekcije CMV prema pasimni utvrđeno je da nema pasminske predispozicije ($p=0,48$). Prisutnost CMV bila podjednako zastupljena između čistokrvnih pasa i mješanaca. Zbog nedovoljnog broja jedinki pojedine pasmine, te nedostupnosti podataka o zastupljenosti pojedinih pasmina u općoj populaciji pasa na području grada Zagreba, nije bilo moguće odrediti pasminsku predispoziciju za oboljevanje od CMV. Dobna predispozicija je izrazita ($p=0,0013$). U skupini pasa u dobi do dva mjeseca nije bila dokazana infekcija CMV, dok u skupini od dva do četiri mjeseca starosti, u šest uzoraka bio je prisutan CMV (22,22%), u trećoj skupini od šest mjeseci do godine i šest mjeseci starosti, u njih 17 potvrđen je CMV. U skupini pasa starijih od tri godine, samo je jedan pas imao dokazanu infekciju CMV.

Grafikon 2. Dokazana infekcija CMV u pasa razvrstanih po dobnim kategorijama.



Spolna predispozicija prema infekciji CMV nije dokazana ($p=0,19$). Nije ustanovljena statistička značajnost infekcije CMV na razvoj proljeva, povraćanja, niti povraćanja i povraćanja između pasa s akutnim gastroenteritisom koji su bili inficirani odnosno koji nisu bili inficirani MCV. Pojava krvavog proljeva također nije pokazala statističku značajnost ($p=0,74$). Zanimljivo je da niti pojava respiratornih kliničkih znakova nije bila statistički značajna ($p=0,93$). Nije ustanovljen statistički značajan utjecaj prisutnosti infekcije CMV na preživljavanje ($p=0,99$) niti na duljinu hospitalizacije ($p=0,78$). Iako se infekcija CMV javljala zajedno s drugim uzročnicima gastroenteritisa, nije dokazana statistička povezanost niti sa jednom od njih. Usporedbom pasa s akutnim gastroenteritisom, te onih pozitivnih i negativnih na MCV u odnosu na koinfekcije drugim virusima koji uzrokuju gastroenteritise nije dobiven statistički značajan rezultat. Statističkom obradom uzoraka pozitivnih i

Slika 5. Filogenetsko stablo CMV sojeva.



Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem ML metode koristeći Hasegawa-Kishino-Yano model (HASEGAWA i sur., 1985.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-7033,47). Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu. Kao vanjska grupa za potrebe postavljanja izvorišta stabla korišteni je BPV soj i soj bocavirusa deva.

Slika 6. Filogenetsko stablo sojeva CMV s područja RH.



Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem ML metode koristeći Hasegawa-Kishino-Yano model (HASEGAWA i sur., 1985.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-2723,57). Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu. Kao vanjska grupa za potrebe postavljanja izvorišta stabla korišteni je BPV soj i soj bocavirusa deva.

Filogenetskom analizom pokazano je međusobno grupiranje većine CMV sojeva iz ovog istraživanja u jednu skupinu (G1) zajedno s izolatima s područja Azije, Sjeverne Amerike i

Portugala. Četiri uzorka čine posebnu granu filogenetskog stabla koji međusobno dijele veću homologiju nukleotidnog slijeda nego s ostalim poznatim izolatima CMV iz baze gena. Ostali izolati bocavirusa pasa izdvojeni su i više su srodni međusobno nego s sojevima minutnog virusa pasa.

Izdvojenost sojeva 16/15, 222/16, 131/16 i 126-V (G2) vidljiva je i na filogenetskom stablu koje obuhvaća samo izolate iz ovog istraživanja.

Određivanjem nukleotidnog slijeda cijelog NS1 gena te gotovo cijelog NP1 gena bilo je moguće ustanoviti izmjene na razini nukleotida i aminokiselina.

Slika 7. Izmjene u aminokiselinskom slijedu NS1 proteina CMV sojeva.

✓Name	E	I	L	N	H	N	D	I	S	Y	E	E	F	E	E	W	I	T	N	F	D	F	S	L	L	D	S	P	E	T	P	N	A	T	T	P	S	R	K	R	T	S	S	D	E	T	I	N	S	P	P							
✓1. GA 3					
✓2. CMV_SH1	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓3. AF495467_USA			
✓4. CMV_Portugal	K	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.	
✓5. CMV 97-047_Japan	K	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.	
✓6. CMV 08-017_Japan	K	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.	
✓7. CMV 97-114_Japan	K	M	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.	
✓8. CMV HM-6_Korea	K	N	V	.	N	S	.	S	L	A	E	.	.	T	T	.	.	
✓9. CMV	K	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.
✓10. 302/16_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓11. 126/16_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓12. 309/16_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓13. 77/15_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓14. 131/16_1	N	S	Q	
✓15. 34/16_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓16. 19/16_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓17. 117/17_1	K	D	S	.	S	I	A	E	.	.	T	T	.	.		
✓18. 220/17_1	T	N	S	Q			
✓19. 16/15_1	N	S	G	Q		

Na osnovu broja izmjena nukleotida i broja izmjena u aminokiselinskom sastavu izračunata je Z vrijednost za pojedine parove nukleotidnih slijedova koja je jasno govorila o pozitivnoj selekciji na razini NS1 gena.

Slika 9. Matriks Z vrijednosti pojedinih parova nukleotidnih slijedova NS1 gena CMV izolata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. GA 3		-4.63252	-4.75585	-4.57891	-4.63333	-5.47578	-4.80833	-4.63374	-4.75585	-5.51041	-5.65648
2. 302/16_1	1.00000		1.41500	-0.13014	2.00222	-6.62625	-0.13014	2.00222	1.41500	-6.66312	-6.79272
3. 126/16_1	1.00000	0.07983		-0.68866	1.41500	-6.72226	-0.68866	1.41500	0.00000	-6.75738	-6.88558
4. 309/16_1	1.00000	1.00000	1.00000		-0.13080	-6.58565	-0.97481	-0.13113	-0.68866	-6.62214	-6.75217
5. 77/15_1	1.00000	0.02376	0.07983	1.00000		-6.62723	-0.13080	2.00222	1.41500	-6.66422	-6.79386
6. 131/16_1	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000		-6.76348	-6.62772	-6.72226	-2.07488	-2.40004
7. 34/16_1	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000		-0.68866	-0.68866	-6.79919	-7.01771
8. 19/16_1	1.00000	0.02376	0.07983	1.00000	0.02376	1.00000	1.00000		1.41500	-6.66477	-6.88558
9. 117/17_1	1.00000	0.07983	1.00000	1.00000	0.07983	1.00000	1.00000	0.07983		-6.75738	-6.88558
10. 220/17_1	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000		-1.82310
11. 16/15_1	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	

Plavo su označene vrijednosti razlike tih i supstituirajućih mutacija po pojedinom mjestu u slijedu nukleotida. Crno su označene p vrijednosti za nultu hipotezu o pozitivnoj evoluciji za svaki od parova CMV sojeva.

5. RASPRAVA

Vrlo je malo podataka o proširenosti i kliničkom značaju infekcije CMV u pasa. Prva istraživanja pokazala su da se protutijela za ovaj virus mogu naći u komercijalnim pripravcima seruma pasa (BINN i sur., 1970.). Seroprevalencija je izrazito visoka u SAD (50-87,5%) (MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.), a u europskim zemljama je daleko manja i kreće se od 5,6% u Njemačkoj do 24,17% u Italiji (RINALDO i sur., 2000.; MANTEUFEL i TRUYEN, 2008.). Iako je CMV opisan prvi puta još 1967. godine odgovor na pitanje o njegovoj patogenosti još nije u potpunosti odgovoreno. U terenskim uvjetima infekcija CMV povezuje se s znakovima povraćanja, proljeva, otežanog disanja i uginućima u štenaca (EUSTER i NAIM, 1977.; HARRISON i sur., 1992.; JARPLID i sur., 1996.). U odraslih pasa infekcija CMV prolazi asimptomatski iako su opisani slučajevi teškog gastroenteritisa u odraslih pasa (OSHIMA i sur., 2010.). Iako su opisane i teške bronhopneumonije u štenaca prilikom razudbe štenaca uginulih nakon infekcije CMV promjene se nalaze na tankom crijevu, a gotovo da izostaju na plućima neovisno o kliničkoj slici (CARMICHAEL i sur., 1994.). Ovo se značajno razlikuje od kliničke slike i patoanatomskog nalaza prilikom pokusnih infekcija. Osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog stoljeća provedeno je nekoliko istraživanja patogenosti ovog uzročnika pokusnim inficiranjem pasa i u kliničkoj slici uvijek su dominirali znakovi respiratorne infekcije isto kao i prilikom razudbe kada su se nalazile promjene koje odgovaraju bronhopneumoniji (MACARTNEY i sur., 1988; CARMICHAEL i sur., 1991; CARMICHAEL i sur., 1994.). Pokusne infekcije u gravidnih kuja klinički su se očitovale različito ovisno o stadiju graviditeta (CARMICHAEL i sur., 1991.). Infekcije do 30. Dana graviditeta uvijek dovodi do uginuća plodova i njihove resorpcije (CARMICHAEL i sur., 1991; CARMICHAEL i sur., 1994.). Infekcija gravidnih kuja kasnije u graviditetu može se različito očitovati: resorpcija plodova, pobačaj ili rađanje mrtve ili avitalne štenadi (CARMICHAEL i sur., 1991.).

Istraživanjem provedenim za potrebe izrade ovog diplomskog rada po prvi puta je dokazana prisutnost CMV u populaciji pasa na području RH. Na području RH kod pasa sa znakovima akutnog gastroenteritisa prevalencija infekcije CMV bila je 9,72%, u zdravih pasa 2,67% dok je u pasa s reproduktivnim poremećajima bila 2,5%. Nažalost ne postoje dostupni podaci iz drugih europskih država koji bi omogućili usporedbu vrijednosti prevalencije infekcije CMV na osnovu dokaza uzročnika u obriscima sluznice rektuma i vagine PCR metodom. Podaci iz Kine govore da se prevalencija svih CBoV u pasa s proljevom kreće između 4,6 i 7,5% (LAU

i sur., 2012.; GUO i sur., 2016.). Zbog nedostatka odgovarajućih podataka jedino je moguće načiniti usporedbu s vrijednostima seroprevalencije u Italiji i Njemačkoj te uz ograničenja ove usporedbe vrijednost prevalencije u ovom istraživanju kreće se u tim granicama.

Određivanje prevalencije CMV infekcije u tri skupine pasa omogućilo je i ustanovljavanje kliničkog značaja CMV infekcije u terenskim uvjetima. Usporedbom dobivenih vrijednosti nepobitno je dokazano da se infekcija CMV češće javlja u pasa sa znakovima akutnog gastroenteritisa nego u zdravih životinja te je s prevalencijom od gotovo 10% CMV značajan patogen probavnog sustava. Po drugoj strani nepobitno je dokazano da infekcija CMV nije značajan uzrok reproduktivnih poremećaja u pasa jer je prevalencija u pasa s reproduktivnim poremećajima odgovarala onoj u zdravih pasa. Nadalje psi oboljeli od akutnog gastroenteritisa, a koji su bili inficirani CMV, nisu češće pokazivali znakove infekcije respiratornog sustava. Ovo su vrlo važni podaci jer rezultati ovog istraživanja po prvi puta sveobuhvatno govore o kliničkom značaju infekcije CMV. Minutni virus pasa u terenskim uvjetima primarno je patogen probavnog sustava, rijede respiratornog dok je njegov utjecaj na reproduktivne poremećaje manje značajan.

Kao i u većine studija i u ovoj CMV infekcija bila je praćena koinfekcijom s drugim virusnim patogenima gastrointestinalnog sustava. Upravo zbog ovog podatka se često dovodilo u pitanje patogenost CMV uopće te je često smatran oportunističkom infekcijom (CARMICHAEL i sur, 1991.; CARMICHAEL i sur., 1994.). Slično se navodi i u drugim životinjskih vrsta, te je i kod svinja infekcija bocavirusima praćena infekcijama drugim virusima, slično kao i u ljudi (ALLANDER i sur., 2007.; HUANG i sur., 2014.).

Dostupni podaci iz nacionala, anamneze i kliničke slike omogućili su i određivanje čimbenika rizika. Psi iz skloništa za nezbrinute životinje češće budu inficirani CMV. Ovaj podatak ne začuđuje zbog uvjeta u kojima se drže ovakve životinje, izloženosti stresu, ali i izrazitoj otpornosti uzročnika u okolišu te je širenje zaraze u uvjetima držanja većeg broja životinja na jednom mjestu olakšano. Ono što je vrlo zanimljivo je i izrazita dobna dispozicija kod ove infekcije. Dvije dobne skupine su najugroženije: starosti dva do četiri mjeseca i šest do 18 mjeseci. U ovoj drugoj skupini bilo je 60,71% svih pozitivnih životinja. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o dobnoj dispoziciji za infekciju, samo podaci o teškoj kliničkoj manifestaciji bolesti u štenaca u prvim tjednima života (CARMICHAEL i sur., 1991.; JARPLID i sur., 1991.). Izrazita dobna predispozicija postoji i kod bocavirusne infekcije u ljudi, infekcija HuBoV redovito bude dokazana u djece do dvije godine starosti (ALLANDER i sur., 2007.; PELTOLA i sur., 2013.). Ovo je moguće objasniti nepotpunom razvijenošću

imunskog sustava u ranoj životnoj dobi, kako ljudi tako i životinja te lakšem nadvladavanju imunskog odgovora (PASTORET, 2007; SIEGRIST, 2007.). U kasnijoj životnoj dobi češća infekcija je moguće posljedica češćeg socijalnog kontakta s drugim psima te se na taj način povećava mogućnost infekcije CMV.

Određivanjem nukleotidnog slijeda produkata PCR metode dobiveni su slijedovi većeg dijela VP gena koji se običavno koristi za filogenijsku analizu CMV. Očekivano većina sojeva dokazanih u ovom istraživanju grupirala se zajedno formirajući zasebnu skupinu hrvatskih izolata unutar skupine CMV. Zanimljivo četiri izolata čine posebnu granu na filogenijskom stablu koja čini posebnu granu i na filogenijskom stablu koje je obuhvaćalo poznate izolate CMV iz različitih dijelova svijeta. Ovo govori o složenosti molekularne epizootologije CMV na području RH. Zanimljivo je da su tri pripadnika ove skupine sojeva CMV nađeni jedino u pasa s akutnim gastroenteritisom starih dva do 4 mjeseca dok se u mlađih i starijih jedinki nisu javljali. Ovo se može upućivati na različitu epizootologiju različitih sojeva CMV međutim zbog nedovoljnog broja uzoraka nije bilo moguće detaljnije odrediti utjecaj pojedinih čimbenika na ovu podskupinu izolata.

Analiza nukleotidnih i aminokiselinskih slijedova virusne DNK donjela je neočekivane rezultate. Minutni virus pasa je pripadnik porodice *Parvoviridae* i kao svim pripadnicima ove porodice kapsida mu je izgrađena od tri strukturna proteina VP1, VP2 i VP3 (HALDER i sur., 2012.; KAILASAN i sur., 2016.; MIETZSCH i sur., 2017.). Ovi strukturni proteini osim gradivne uloge imaju ulogu i u sklapanju virusne čestice, ali i nositelji su antigenskih svojstava (HALDER i sur., 2012.). Opće je prihvaćeno da izmjene u aminokiselinskom sastavu strukturnih gena omogućava nadilaženje imunskog odgovora domaćina što često dovodi do evolucije novih sojeva virusa kao što je to slučaj kod drugog poznatog patogena pasa iz ove porodice parvovirusa-2 pasa (TSAO i sur., 1991.; HUEFFER i PARRISH, 2003.). Osim strukturnih, genom CMV nosi informacije i za dva nestrukturna gena NS1 i NP1, pri čemu je NP1 gen upravo značajka koja razlikuje rod *Bocavirus* u odnosu na ostale pripadnike skupine parvovirusa (SHWARTZ i sur., 2002.). Ovi nestrukturni proteini općenito imaju enzimatsku aktivnost i nisu izloženi imunskom sustavu domaćina te su izmjene u aminokiselinskom slijedu puno rjeđe (TSAO i sur., 1991.; HALDER i sur., 2012.). Suprotno ovim opće prihvaćenim spoznajama o evoluciji parvovirusa izolati u ovom istraživanju najmanji broj izmjena u aminokiselinskom sastavu pokazivali su upravo u strukturnim proteinima kapside, a najveći u nestrukturnom proteinu NS1. I u NP1 proteinu prosječan broj izmjena aminokiselina je bio veći nego u VP2 proteinu. Ovi podaci nam mogu dati važne

podatke o evoluciji i patogenezi infekcije CMV, ali i bocavirusima općenito. Kod ostalih parvovirusa postoji mali broj dokaza da infekcija utječe na urođenu imunost domaćina (LIN i sur., 2013.; MATTEI i sur., 2013.). Utjecaj nestrukturnih proteina bocavirusa na stvaranje IFN β , važnog medijatora urođenog imunskog odgovora, prvi puta je opisan kod HuBoV (ZHANG i sur., 2012.). Neposredan utjecaj NS1 i NP1 na izlučivanje ovog medijatora potvrđen je i kod bocavirusa svinja, a poremetnje funkcije makrofaga opisane su i u pasa inficiranih CMV (DECARO i sur., 2002.; ZHANG i sur., 2015.). Kako je već navedeno i u ovom istraživanju infekcija CMV praćena je koinfekcijama drugim virusima i taj podatak se često navodio kao dokaz oportunističke prirode infekcije CMV. Dinamika izmjena aminokiselinskog slijeda u nestrukturnim i strukturnim genima CMV ustanovljena u ovom istraživanju daje osnovu za potpuno novi pogled na značaj infekcije CMV. Osim izravne patogenosti moguće je da ovaj uzročnik slabi urođeni imunski sustav pasa te omogućuje lakšu uspostavu infekcije drugim virusnim uzročnicima, od kojih neki, kao CPV-2, mogu dovesti i do letalnih ishoda.

U konačnici ovaj rad je dao odgovor na veliki broj pitanja koja se dugo postavljaju kada je riječ o infekciji pasa CMV. Osim odgovora na pitanje o patogenosti i kliničkoj manifestaciji infekcije CMV te čimbenicima rizika omogućio je i barem djelomični uvid u molekularne osnove evolucije uzročnika te mehanizma nadvladavanja obrambenih snaga domaćina pripadnika roda bocavirus i razlikama u patogenezi u odnosu na ostale parvoviruse. Ovo je neobično važan podatak koji može pomoći u borbi protiv bocavirusnih infekcija u pasa, ali što je još mnogo važnije i u ljudi.

6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija minutnim virusom pasa je prisutna na području RH s prevalencijom od 9,72% u pasa s akutnim gastroenteritisom, 2,5% u pasa s reproduktivnim poremećajima i 2,65% u zdravoj populaciji pasa.
2. Minutni virus pasa je važan patogen probavnog sustava pasa i kao takav ima klinički značaj, reproduktivni poremećaji i respiratorne infekcije nisu značajno kliničko očitovanje infekcije u terenskim uvjetima.
3. Postoji izrazita dobna predispozicija, psi starosti dva do četiri mjeseca i starosti između šest i osamnaest mjeseci, koja se razlikuje od podataka dobivenih prilikom pokusnih infekcija.
4. Na području Republike Hrvatske cirkuliraju minimalno dvije skupine sojeva te je molekularna epizootiologija infekcije minutnim virusom pasa složena.
5. Minutni virus pasa ima jedinstveni model evolucije koji se zasniva na izmjenama u aminokiselinskom sastavu nestrukturnih gena i kao takav može poslužiti kao model za praćenje evolucije drugih pripadnika roda Bocavirus.

7. POPIS LITERATURE

1. ALLANDER, T., T. JARTTI, S. GUPTA, H.G. NIESTERS, P. LEHTINEN, R. OSTERBACK, T. VUORINEN, M. WARIS, A. BJERKNER, A. TIVELJUNG-LINDELL, B. G. VAN DEN HOOGEN, T. HYYPIÄ, O. RUUSKANEN (2007): Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*; 44: 904–910.
2. ARMICHAEL, L.E., D.H. SCHLAFER, A. HASHIMOTO (1991): Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *Cornell Vet.* 81(2):151-71.
3. BINN, L. N., E. C. LAZAR, G. A. EDDY, AND M. KAJIMA (1970.): Recovery and characterization of a minute virus of canines¹. *Infection and immunity*, p. 503-508. American society for microbiology Vol. 1, No. 5.
4. BODEWES, R., S. LAPP, K. HAHN, A. HABIERSKI, C. FORSTER, M. KONIG, P. WOHLSEIN, A. D.M.E. OSTERHAUS, W. BAUMGARTNER (2013): Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary microbiology* 174, 1–8.
5. CARMICHAEL, L. E., D. H. SCHLAFER, A. HASHIMOTO (1994): Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): Pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:165-174.
6. CHOI, J.-W., K.-H. LEE, J.-I. LEEB, M.-H. LEEA, K.-K. LEEA, J.-K. OEM (2015): Genetic characteristics of canine bocaviruses in Korean dogs. *Veterinary microbiology* 179, 177–183.
7. GUO, D., Z. WANG, S. YAO, C. LI, Y. GENG, E. WANG, X. ZHAO, M. SU, S. WEI, A, X. WANG, L. FENG, Y.-F. CHANG, D. SUN (2016): Epidemiological investigation reveals genetic diversity and high co-infection rate of canine bocavirus strains circulating in Heilongjiang province, Northeast China. *Research in Veterinary Science* 106, 7–13.
8. CONCEIÇÃO-NETO, N., R. GODINHO, F. ÁLVARES, C. K. YINDA, W. DEBOUTTE, M. ZELLER, L. LAENEN, E. HEYLEN, S. ROQUE, F. PETRUCCI-FONSECA, N. SANTOS, M. V. RANST, J. R. MESQUITA, J. MATTHIJNSSENS (2017): Viral gut metagenomics of sympatric wild and domestic canids, and monitoring of viruses: Insights from an endangered wolf population. *Ecol Evol.* 7:4135–4146.

9. DECARO, N., M. ALTAMURA, A. PRATELLI, M. PEPE, A. TINELLI, D. CASALE, V. MARTELLA, A. TAFARO, M. CAMERO, G. ELIA, M. TEMPESTA, E. JIRILLO, C. BUONAVOGLIA (2002): Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection. *New Microbiol*; 25: 291–298.
10. EUGSTER, A.K., C. NAIM (1977), Diarrhea in puppies: parvoviruslike particles demonstrated in their feces. *Southwest Vet* 30:5960.
11. FAN NG, F. T, J. R. MESQUITAC, M. S. J. NASCIMENTOD, N. O. KONDOVA, W. WONGA, G. REUTERE, N. J. KNOWLESF, E. VEGAG, M. D. ESONAH, X. DENG, J. VINJÉG, E. DELWARTA (2014): Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Vet Microbiol.* 171(0): 102–111.
12. FASINA, O.O., S. STUPPS, W. FIGUEROA-CUILAN, D. J. PINTEL (2017): The minute virus of canines (MVC) NP1 protein governs the expression of a subset of essential NS proteins via its role in RNA processing. Accepted manuscript posted online, *J. virol.* American society for microbiology.
13. DECARO, N., F. AMORISCO, D. LENOCI, A. LOVERO, M. L. COLAIANNI, M. LOSURDO, C. DESARIO, V. MARTELLA, C. BUONAVOGLIA (2012): Molecular characterization of Canineminute virus associated with neonatal mortality in a litter of Jack Russell terrier dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 24(4), 755–758.
14. HALDER, S., R. NG, M. AGBANDJE-MCKENNA (2012): Parvoviruses: structure and infection. *Future Virol* 7:253–278.
15. HARRISON, L.R, ELOISE L. STYER, A. R. PURSELL, L. E. CARMICHAEL, J. C. NIETFELD (1992): Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *J Vet Diagn Invest* 4: 19-22.
16. HASEGAWA, M., H. KISHINO, T. YANO (1985): Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174
17. HUANG, J., S. MOR, S.K., ERBER, J., VOSS, E. AND GOYAL, S.M., 2014. Detection and characterization of porcine bocavirus in the United States. *Archives of virology*, 159(7), pp.1797-1801.
18. HUEFFER, K., C. R. PARRISH (2003): Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 392-398.
19. JARPLID, B., H. JOHANSSON, L. E. CARMICHAEL: A fatal case of pup infection with minute virus of canines. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 484–487.

20. KAILASAN, S., J. GARRISON, M. ILYAS, P. CHIPMAN, R. MCKENNA, K. KANTOLA, M. SÖDERLUND-VENERMO, I. KUCINSKAITE-KODZE, A. ZVIRBLIENE, M. AGBANDJE-MCKENNA (2016): Mapping antigenic epitopes on the human bocavirus capsid. *J Virol* 90:4670 – 4680.
21. KAPOOR, A., N. MEHTA, E. J. DUBOVI, P. SIMMONDS, L. GOVINDASAMY, J. L. MEDINA, C. STREET, S. SHIELDS, W. I. LIPKIN (2012) Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. *Journal of general virology*, 93, 341–346.
22. LAU, S. K. P., P. C. Y. WOO, H. C. YEUNG, J. L. L. TENG, Y. WU, R. BAI, R. Y. Y. FAN, K.-H. CHAN, K.-Y. YUEN (2012): Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus. *Journal of general virology*, 93, 1573–1582.
23. KUMAR, S., G. STECHER, K. TAMURA (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33:1870-1874.
24. LI, L., P. A. PESAVENTO, C. M. LEUTENEGGER, M. ESTRADA, L. L. COFFEY, S. N. NACCACHE, E. SAMAYOA, C. CHIU, J. QIU, C. WANG, X. DENG, E. DELWART (2013): A novel bocavirus in canine liver. *Virology journal*, 10:54.
25. LIN, W., Z. QIU, Q LIU, S. CUI (2013): Interferon induction and suppression in swine testicle cells by porcine parvovirus and its proteins. *Vet Microbiol* 163(1-2):157-61.
26. MACARTNEY, L., C. R. PARRISH, L.N. BINN, L.E. CARMICHAEL (1988): Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet* 78: 131-145.
27. MANTEUFEL, J., U. TRUYEN (2008): Animal Bocaviruses: A brief review. *Intervirology*; 51:328–334.
28. MATTEI, L.M., S.F. COTMORE, P. TATTERSALL, A. IWASAKI (2013): Parvovirus evades interferon-dependent viral control in primary mouse embryonic fibroblasts. *Virology*. 442 (1):20-7.
29. MIETZSCH, M., S. KAILASAN, J. GARRISON, M. ILYAS, P. CHIPMAN, K. KANTOLA, M. E. JANSSEN, J. SPEAR, D. SOUSA, R. MCKENNA, K. BROWN, M. SÖDERLUND-VENERMO, T. BAKER, M. AGBANDJE-MCKENNA (2017) Structural insights into human bocaparvoviruses. *Virol* 91: e00261-17.
30. MOCHIZUKI, M., M. HASHIMOTO, T. HAJIMA, M. TAKIGUCHI, A. HASHIMOTO, Y. UNE, F. ROERINK, T. OHSHIMA, C. R. PARRISH, L. E.

- CARMICHAEL (2002): Virologic and serologic identification of minute virus of canines (Canine parvovirus type 1) from dogs in Japan. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 40, No. 11, p. 3993–3998.
31. OHSHIMA, T., K. KAWAKAMI, T. ABE, M. MOCHIZUKI (2010): A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. *Veterinary microbiology* 145., 334–338.
 32. PASTORET, P. P. (2007): Challenges and issues of early life vaccination in animals and humans *journal of comparative pathology*. Volume 137, Supplement 1, Pages S2-S3
 33. PELTOLA, V., M. SÖDERLUND-VENERMO, T. JARTTI (2013): Human boca virus infections. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32: 178– 179.
 34. RINALDO, D, M. FOTI, T. GINOPRELLI, B.M. ORLANDELLA, D. BUONAVAGLIA (2000): Epidemiologia dell' infezione da Parvovirus tipo 1 nel cane: ricerca di anticorpi in cani della Sicilia. *Obiet Docum Vet* 2000; 2 1: 17–19.
 35. SCHWARTZ, D., B. GREEN, L. E. CARMICHAEL, C. R. PARRISH (2002): The Canine Minute Virus (Minute Virus of Canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology* 302, 219–223.
 36. SHAN, T.L., L. CUI, X. Q. DAI, W. GUO, X. G. SHANG, Y. YU, W. ZHANG, Y. J. KANG, Q. SHEN, Z. B. YANG, J. G. ZHU, X. G. HUA (2010): Sequence analysis of an isolate of minute virus of canines in China reveals the closed association with bocavirus. *Mol Biol Rep*, 37:2817–2820.
 37. FU, X., X. WANG, B. NI, H. SHEN, H. WANG, X. ZHANG, S. CHEN, S. SHAO, W. ZHANG (2011): Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus. *Virology Journal* 8:182.
 38. SIEGRIST, C.A. (2007): The Challenges of Vaccine Responses in Early Life: Selected Examples. *Journal of Comparative Pathology* Volume 137, Supplement 1, Pages S4-S9-9.
 39. SUN, Y., A. Y. CHEN, F. CHENG, W. GUAN, F. B. JOHNSON, J. QIU (2009): Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses. *Journal of virology*, Vol. 83, No. 8, p. 3956–3967.
 40. TSAO, J., M. S. CHAPMAN, M. AGBANDJE, W. KELLER, K. SMITH, H. WU, M. LUO, T. J. SMITH, M. G. ROSSMANN, R. W. COMPANS, C. R. PARRISH (1991):

The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. 251, 1456-1464.

41. ZÁDORI, Z., J. SZELEI, M.C. LACOSTE, Y. LI, S. GARIÉPY, P. RAYMOND, M. ALLAIRE, I.R. NABI, P. TIJSSEN (2001): A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell*. 1(2): 291-302.
42. ZHANG, R., L. FANG, D. WANG, K. CAI, H. ZHANG, L. XIE, Y. LI, H. CHEN, S. XIAO (2015): Porcine bocavirus NP1 negatively regulates interferon signaling pathway by targeting the DNA-binding domain of IRF9. *Virology* 485; 414–421.

8. SAŽETAK

U razdoblju od 1. lipnja 2015. do 10. listopada 2017. godine iz veterinarskih organizacija s područja Republike Hrvatske ukupno je prikupljeno i obrađeno 573 obrisaka rektuma pasa koji su pokazivali znakove akutnog gastroenteritisa, 198 obrisaka sluznica vagine i 196 obrisaka sluznice nosa pasa iz uzgajivačnica s reproduktivnim poremećajima, te 75 obrisaka rektuma zdrave populacije pasa. Osim ovih uzoraka za 288 pasa sa znakovima akutnog gastroenteritisa, prikupljeni su i podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkoj slici, tijeku i ishodu liječenja. Metodom lančane reakcije polimeraze u prikupljenim obriscima dokazivana je prisutnost minutnog virusa pasa.

Na osnovu rezultata pretrage uzoraka ustanovljeno je da je infekcija minutnim virusom pasa prisutna u 9,72% životinja, u pasa s reproduktivnim poremećajima u 2,5% te u zdravoj populaciji u 2,67% pasa. Ovime je po prvi puta dokazana infekcija ovim uzročnikom na području Republike Hrvatske. Usporedba dobivenih vrijednosti prevalencije infekcije minutnim virusom pasa u različitim istraživanim populacijama pokazala je da je ovaj virus ima klinički značaj kao značajan patogen probavnog sustava pasa, međutim njegov značaj kao uzročnika reproduktivnih poremećaja je daleko manji. Od čimbenika rizika dob životinje se pokazala kao najznačajniji. Nakon određivanja nukleotidnog slijeda umnoženih odsječaka virusnog genoma ustanovljeno je postojanje dvije skupine sojeva koje cirkuliraju na području Republike Hrvatske, što govori o daleko složenijoj molekularnoj epizootiologiji ove infekcije nego što je očekivano. Određeni nukleotidni slijedovi pokazali su i jedinstveni model evolucije bocavirusa na molekularnoj razini koji može poslužiti kao model evolucije bocavirusnih infekcija u drugih vrsta životinja, ali i ljudi.

9. SUMMARY

Prevalence, risk factors and clinical importance of canine bocavirus infection in dogs

Between June 1st 2015 and October 10th 2017 a total of 573 rectal swabs taken from dogs with clinical signs of acute gastroenteritis, 198 vaginal swabs and 196 nasal swabs from dogs with reproductive pathology and 75 rectal swabs from healthy dogs. Samples were obtained from veterinary organisations in different parts of Croatia. For 288 dogs data, regarding signalment, medical history, clinical course and outcome of the treatment were collected as well. All collected samples were tested for presence of canine minute virus (CMV), using polymerase chain reaction.

Based on the results of diagnostic testing, it was concluded that CMV infection was present at 9.72% samples taken from dogs with signs of gastroenteritis, 2.5% of dogs with reproduction disorders and 2.67% of dogs who were healthy, without any clinical signs. This report is the first evidence of the CMV infection in dogs on territory of Croatia. The evaluation of prevalence in different populations of the dogs in this study showed that CMV has a clinical role as a significant pathogen of gastrointestinal tract in dogs. It's role as reliable cause of reproductive disorders was less important. Statistics showed that main risk factor was animal age. After sequencing viral genome, it was discovered that two groups of the CMV strains are present on Croatian territory. It points out that CMV molecular epizootiology is far complicated than previously thought. The nucleotide sequences revealed a unique model of bocavirus evolution on molecular level, which can serve as a model of bocavirus infections in other species, including humans.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 6. lipnja 1991. godine u Zagrebu gdje sam završio “OŠ Petar Zrinski”. Daljnje obrazovanje nastavio sam u 2. Općoj Gimnaziji u Zagrebu, od 2005. do 2009. godine. Za vrijeme trajanja gimnazijskog obrazovanja bio sam član juniorske skijaške reprezentacije. Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2008. godine. Tijekom studija bio sam aktivni član udruge “IVSA” studenata veterinarske medicine, s kojom sam boravio na studentskoj razmjeni u Madridu, Španjolska. Dužnost predstavnika studenata godine obavljao sam za vrijeme akademske godine 2015, uz povremeno volontiranje u ambulanti za male životinje “Bibino”. Od 2015. do 2016. godine volontirao sam na klinici Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, gdje sam zahvaljući djelatnicima klinike imao priliku učiti, raditi i razmišljati o različitim segmentima veterinarske medicine. U sklopu diplomskog rada 2016. godine pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Vladimira Stevanovića imao sam priliku stjecati nova znanja iz područja molekularne dijagnostike, u sklopu Virusološkog laboratorija već navedenog Zavoda. Veterinarsku praksu odrađivao sam u veterinarskoj ambulanti “Buba”.